

# Вестник Московского университета

НАУЧНЫЙ ЖУРНАЛ

Основан в ноябре 1946 г.

Серия 16

БИОЛОГИЯ

Том 73 • № 4 • 2018 • ОКТЯБРЬ — ДЕКАБРЬ

Издательство Московского университета

Выходит один раз в три месяца

## СОДЕРЖАНИЕ

### От редактора

Хохлов А.Н. Клеточно-кинетические подходы к поиску геропротекторов: тридцать лет спустя . . . . . 227

### Обзоры

Бейлин А.К., Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А. Методы генной терапии для лечения врожденного буллезного эпидермолиза. . . . . 233

Челомбитько М.А. Роль активных форм кислорода в воспалении. Мини-обзор . 242

### Биофизика

Маторин Д.Н., Тимофеев Н.П., Глинушкин А.П., Братковская Л.Б., Заядан Б.К. Исследование влияния грибковой инфекции *Bipolaris sorokoniana* на световые реакции фотосинтеза пшеницы с использованием флуоресцентного метода . . . . . 247

### Ботаника

Наконечная О.В., Нестерова С.В., Воронкова Н.М. Прорастание семян видов рода *Aristolochia* (Aristolochiaceae) . . . . . 254

### Гидробиология

Радченко И.Г., Шевченко В.П., Кравчишина М.Д., Ильинский В.В., Георгиев А.П., Толстиков А.В., Чульцова А.Л., Ильяш Л.В. Первая регистрация цветения *Thalassiosira angulata* (Bacillariophyceae) в Белом море: пространственное распределение и сопутствующие виды . . . . . 263

### Физиология

Лукоянов М.В., Гордлеева С.Ю., Григорьев Н.А., Савосенков А.О., Лотарева Ю.А., Пимашкин А.С., Каплан А.Я. Изучение характеристик интерфейса мозг-компьютер на основе представления движений с быстрой действующей тактильной обратной связью . . . . . 269

### Энтомология

Беляев О.А., Фарисенков С.Э. Исследование аллометрии формы и жилкования крыльев насекомых. Часть 1. Hymenoptera . . . . . 277

Указатель статей, опубликованных в журнале “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” в 2018 году . . . . . 285

## CONTENTS

### **Editorial**

- Khokhlov A.N. Cell kinetic approaches to the search for anti-aging drugs: Thirty years after . . . . . 227

### **Reviews**

- Beylin A.K., Gurskaya N.G., Vorotelyak E.A. Methods of gene therapy for treatment of inherited epidermolysis bullosa . . . . . 233  
Chelombitko M.A. The role of reactive oxygen species in inflammation . . . . . 242

### **Biophysics**

- Matorin D.N., Timofeev N.P., Glinushkin A.P., Bratkovskaja L.B., Zayadan B.K. Application of the fluorescence method for investigating the influence of root rot pathogen *Bipolaris sorokiniana* on photosynthetic light reactions in wheat plants . . . . . 247

### **Botany**

- Nakonechnaya O.V., Nesterova S.V., Voronkova N.M. Germination of *Aristolochia* seeds (Aristolochiaceae). . . . . 254

### **Hydrobiology**

- Radchenko I.G., Shevchenko V.P., Kravchishina M.D., Il'inskii V.V., Georgiev A.P., Tolsticov A.V., Tchultsova A.L., Ilyash L.V. The first record of *Thalassiosira angulata* (Bacillariophyceae) bloom in the White Sea: spatial distribution and concomitant species . . . . . 263

### **Physiology**

- Lukoyanov M.V., Gordleeva S.Y., Grigorev N.A., Savosenkov A.O., Lotareva Y.A., Pimashkin A.S., Kaplan A.Y. Investigation of characteristics of motor-imagery brain–computer interface with quick- response tactile feedback . . 269

### **Entomology**

- Belyaev O.A., Farisenkov S.E. A study on allometry of wing shape and venation in insects. Part 1. Hymenoptera . . . . . 277

- Index of papers* published in “Vestnik Moskovskogo Universiteta. Biologia” in 2018 . . . . 285

## ОТ РЕДАКТОРА

УДК 576.35:57.017.6

КЛЕТОЧНО-КИНЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПОИСКУ ГЕРОПРОТЕКТОРОВ:  
ТРИДЦАТЬ ЛЕТ СПУСТЯ

А.Н. Хохлов

*Сектор эволюционной цитогеронтологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

Краткий обзор представлений о возможности использования разработанной автором в 80-х годах XX века клеточно-кинетической модели для тестирования в экспериментах на клеточных культурах потенциальных геропротекторов и геропромоторов — факторов, замедляющих или ускоряющих, соответственно, старение животных и человека. Рассматривается процесс эволюции этой модели — от оценки только скорости размножения и насыщающей плотности клеток в непересеваемой культуре до снятия кривых их выживания в стационарной фазе роста и далее — до анализа возможной взаимосвязи всех частей кривой роста и последующего вымирания клеток. Анализируются возможные подходы к математическому и статистическому анализу получаемых в рамках данной модельной системы результатов. Подчеркивается, что такого рода исследования могут проводиться на клетках самой разной природы (нормальных и трансформированных клетках человека и животных, растительных клетках, дрожжах, микоплазмах, бактериях и др.), что делает возможным эволюционный подход к интерпретации полученных результатов. При этом наиболее перспективными, по мнению автора, являются эксперименты, проводимые на иммортализованных клетках человека и животных, так как они, с одной стороны, не являются раковыми, а с другой — обладают неограниченным митотическим потенциалом и поэтому не “стареют” при многочисленных делениях, как это, например, делают нормальные диплоидные фибробласты человека. Предполагается, что соответствующий математический анализ всей кривой роста и гибели непересеваемой клеточной культуры (от посева в культуральный флакон до полной гибели всех клеток) может позволить уточнить определенные взаимосвязи между развитием и старением многоклеточного организма, а также повысить достоверность выявления перспективных геропротекторов.

**Ключевые слова:** старение, клеточные культуры, геропротекторы, геропромоторы, клеточная пролиферация, “стационарное старение”, кинетика, тест-системы, обзор

В 80-х годах XX века мной была сформулирована идея, согласно которой по кинетике роста клеточной культуры в пределах одного пассажа можно судить о “биологическом возрасте” изучаемых клеток. Она основывалась на данных о том, что чем больше возраст донора диплоидных фибробластов человека, тем меньше скорость размножения этих клеток в культуре и достигаемая ими насыщающая плотность [1]. Схематическая иллюстрация этого феномена представлена на рис. 1. Сходные данные были получены и для нормальных клеток, “стареющих” *in vitro*, т.е. меняющихся при увеличении числа пассажей/делений [2–5]. На основании этого я предположил, что, воздействуя на клетки, культивируемые в пределах одного пассажа (т.е. без пересева), тем или иным химическим или физическим фактором и анализируя кинетику роста данной культуры, можно с определенной вероятностью сделать вывод о том, является ли он геропротектором или геропромотором (соответственно, фактором, замедляющим или ускоряющим старение животных или человека).

При этом, конечно, необходимо обеспечивать клеткам физиологически оптимальные условия для роста (культуральная среда, сыворотка, содержание CO<sub>2</sub> в воздухе и т.п.), в противном случае на кинетику роста мог бы, например, положительно повлиять любой митогенный агент и отрицательно — любой цитостатик. Предполагалось, что изучаемый фактор должен не просто действовать на пролиферативные характеристики клеток, а модифицировать их жизнеспособность. Насыщающая же плотность культуры должна была определяться только контактным торможением клеток (с моей точки зрения, наиболее физиологичный способ ограничения клеточной пролиферации), а не исчерпанием каких-либо ресурсов ростовой среды или ее модификацией размножающимися клетками. При этом некоторое закисление среды в стационарной фазе роста, по-видимому, не является решающим фактором, ограничивающим размножение клеток и приводящим их в дальнейшем к гибели [6, 7]. К сожалению, обеспечение таких условий — достаточно непростая задача, что накладывает на

данную модельную систему (названную мной “клеточно-кинетической моделью для тестирования потенциальных геропротекторов и геропромоторов” [8–10]) некоторые ограничения.

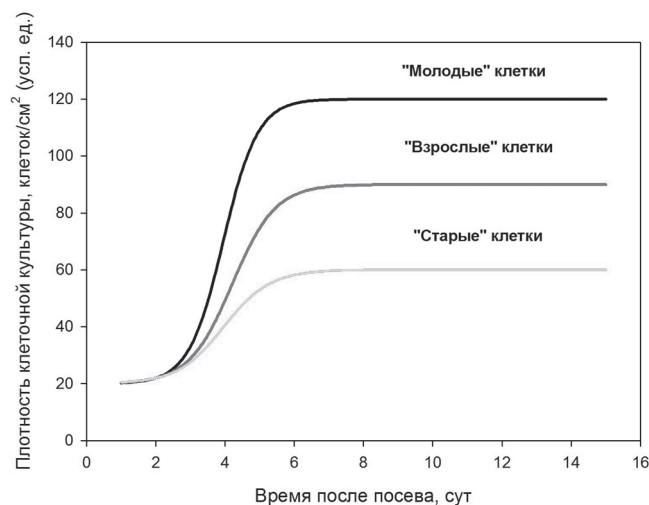


Рис. 1. Схематическое изображение кинетики роста пересаживаемой культуры диплоидных фибробластов человека, полученных от доноров разного возраста

Кроме того, я предположил, основываясь на определенных “эволюционных” представлениях, что сказанное выше должно быть верно не только для нормальных культивируемых клеток с ограниченным митотическим потенциалом, которым свойствен лимит Хейфлика, но и трансформированным клеткам животных и человека, а также бактериям, дрожжам, микоплазмам, растительным клеткам и т.д.

Необходимо подчеркнуть, что в соответствующей литературе, как мной уже неоднократно отмечалось, термин “насыщающая плотность клеточной культуры” достаточно часто либо не очень четко определен, либо заменяется другими терминами, смысл которых остается расплывчатым. Например, в работе Гаццолы с соавт. [2], проведенной на кожных фибробластах 16-летней девочки, были получены данные о строгой обратной корреляции между количеством удвоений клеточной популяции, пройденных культурой, и “плотностью клеток в состоянии сомкнутого монослоя”. К сожалению, это выражение не позволяет судить о том, что в действительности измеряли в работе, ибо четких критериев “сомкнутости” клеток не существует. Мы предпочитаем использовать выражение “насыщающая плотность клеточной культуры”, вкладывая в него следующий смысл: насыщающая плотность — это такая плотность клеток в культуре, при которой полностью прекращается их размножение. При этом надо заметить, что величина ее для разных клеток может очень сильно различаться и определяется, по-видимому, тонкими механизмами межклеточных контактов [11].

В этой связи интересны также данные о том, что некоторые стероидные гормоны, увеличивающие продолжительность жизни *in vitro* (“по Хейф-

лику”) диплоидных фибробластов человека, вызывают изменения кинетики роста этих клеток, свидетельствующие об их “омоложении” [12, 13]. Кроме того, в некоторых случаях изменение кинетики роста *in vitro* клеток человека свидетельствует о наличии у их донора определенных заболеваний и патологических процессов [14].

Для аппроксимации кривых роста изучавшихся нами клеточных культур мы использовали [8–10] уравнение Ферхюльста-Пирла, имеющее следующий вид:

$$N_t = \frac{N_0 \cdot K \cdot e^{r_m \cdot t}}{K - N_0 \cdot (1 - e^{r_m \cdot t})} \quad (1)$$

В этой формуле  $N_t$  — численность размножающейся популяции в момент времени  $t$ ;  $N_0$  — численность популяции в нулевой момент времени;  $r_m$  — мгновенная рождаемость ( $r$ ), определяемая как  $\frac{dN_t}{dt} \cdot \frac{1}{N_t}$ , при малой плотности популяции (т.е. максимально возможное значение  $r$ );  $K$  — высота “плато” на кривой роста популяции (ее насыщающая плотность).

Так как далеко не все посеянные во флакон или чашку Петри клетки способны прикрепиться к поверхности роста и начать делиться, мы заменили в уравнении (1)  $N_0$  (количество посеянных клеток) на  $N_1$  — число клеток, прикрепившихся к поверхности роста через сутки после посева. В связи с этим все кривые роста в наших работах мы строили, начиная их именно с 24-часовой точки. Необходимо заметить, что в случае суспензионных культур такая модификация формулы, по-видимому, не имеет смысла, так как клетки могут начать размножаться практически сразу после посева в свежую среду.

Вводя в соответствующую компьютерную программу экспериментальные данные, описывающие увеличение со временем плотности клеточной культуры, мы, с помощью метода нелинейной регрессии, получаем оценки всех трех параметров ( $N_1$ ,  $K$  и  $r_m$ ), необходимых для построения и последующего анализа кинетических кривых. Попытки подбора параметров  $K$  и  $r_m$  при введении в компьютер конкретного значения  $N_1$ , полученного в эксперименте, показали, что такой способ ухудшает соответствие получаемой функции экспериментальным данным.

В целом ряде проведенных мной и моими коллегами экспериментов на нормальных и трансформированных культивируемых клетках животных и человека было установлено, что, действительно, обнаруженные в геронтологических исследованиях на экспериментальных животных геропротекторы и геропромоторы ведут себя “правильным” образом при испытании на нашей модели. Правда, как оказалось, в некоторых случаях скорость размножения клеток (параметр  $r_m$ ) менялась не так, как ожидалось. А вот насыщающая плотность культуры

(“плато” на кривой роста, параметр  $K$ ), как правило, линейно зависела от дозы используемого фактора — повышалась под действием геропротекторов и понижалась под действием геропромоторов. Конечно, как отмечалось выше, нельзя полностью исключить цитостатическое или митогенное воздействие изученных препаратов/излучений, однако вполне возможно, что и в экспериментально-геронтологических исследованиях на животных эти факторы как раз реализуют свое действие именно таким образом. Впрочем, тот факт, что в некоторых экспериментах геропротекторы повышали высоту “плато”, но не влияли на скорость размножения клеток, позволяет как раз полагать, что такой эффект не определялся митогенным действием изучаемых соединений.

Результаты наших исследований, проведенных в 1980-х годах, изложены в целом ряде работ и суммированы в моей монографии [15] и соответствующем обзоре [10]. С помощью клеточно-кинетической модели мы провели тестирование целого ряда химических и физических факторов, таких как гамма-излучение (классический индуктор радиационного преждевременного старения), ДНК-алкилирующий агент тиофосфамид, низкочастотное электромагнитное поле, антиоксиданты эпигид (гидрохлорид 2-этил-6-метил-3-оксипиридина) и дибунол (бутилированный окситолуол), эфирное масло орегано и др.

Хотя в большинстве наших исследований были получены данные, подтверждавшие наше предположение о том, что выявленные в экспериментах на животных геропротекторы и геропромоторы “правильно” действуют в нашей клеточно-кинетической модели, у нас сложилось впечатление, что эта модельная система, как и модель Хейфлика, является “коррелятивной” [16]. Иначе говоря, получаемые данные, по-видимому, никак не связаны с реальными механизмами старения, а лишь отражают некоторые корреляции. Ситуация похожа на хорошо известную зависимость от возраста человека числа седых волос у него на голове, которое практически никак не коррелирует с вероятностью смерти [17].

В связи с этим в последующие годы мы сосредоточились на другой клеточной модели, названной нами “моделью стационарного старения” (stationary phase aging model). Суть ее подробно изложена в целом ряде наших публикаций (см., например, [18–24] и др.), так что здесь я не буду останавливаться на ее детальном описании. Отмечу только, что, считая эту модель “сущностной”, мы в ее рамках оценивали накопление различных “возрастных” изменений в стационарной культуре нормальных или трансформированных клеток животных или человека. Оказалось, что эти изменения действительно практически всегда совпадают с изменениями клеток стареющего многоклеточного организма. При этом в первое время кинетика гибели клеток в стационарной фазе роста оставалась “за кадром”. Однако впоследствии в некото-

рых экспериментах мы, ориентируясь в том числе и на данные работ по изучению “хронологического старения” дрожжей и бактерий [25–28], получили целый ряд соответствующих кривых выживания клеток в стационарной фазе роста непересеваемой культуры. Математический анализ этих кривых показал, что клетки вымирают в хорошем соответствии с формулой Гомпертца (рис. 2, схематическая иллюстрация сделана на основании данных нескольких наших экспериментов) [29]. В связи с этим в дальнейшем мы провели целый ряд исследований, направленных на анализ влияния некоторых биологически активных соединений как раз на кинетику вымирания культивируемых клеток в стационарной фазе роста (см., например, [7, 29–33]). Предполагалось, что замедление этого процесса может служить основанием для отнесения изучаемого препарата к геропротекторам [34, 35]. При этом все эксперименты мы проводили на хорошо изученной в нашей лаборатории линии трансформированных (но, тем не менее, способных к контактному торможению) клеток китайского хомячка. Мы полагали, что приводящее к ускорению/замедлению гибели клеток при их “стационарном старении” изменение жизнеспособности клеток под влиянием геропротектора (если он, конечно, не является препаратом, селективно действующим на раковые клетки) не должно принципиально зависеть от типа использованных в эксперименте клеток, поэтому не использовали нормальные фибробласты.

Впрочем, как уже отмечалось в одной из наших предыдущих работ [36], замечания в адрес используемых в нашей лаборатории моделей в связи с тем, что большинство экспериментов по тестированию геропротекторов проводятся нами на трансформированных, а не на нормальных клетках млекопитающих, мы слышим довольно часто. Однако такой выбор тест-объекта представляется нам вполне оправданным по следующим соображениям. Выше я уже отмечал, что феномен “стационарного”/хронологического старения свойствен самым разным клеткам, среди которых бактерии, дрожжи, цианобактерии, микоплазмы, клетки животных и растений. При этом “репликативный возраст” клеток с неограниченным митотическим потенциалом не изменяется ни от эксперимента к эксперименту, ни в процессе длительного культивирования как с пересевами, так и без них (в рамках модели “стационарного старения”), чего не скажешь о нормальных диплоидных фибробластах, теломеры которых укорачиваются при каждом делении. А от момента посева клеток до входа их в стационарную фазу роста они могут поделиться до 10 раз! Таким образом, нормальные клетки, входящие в стадию “плато”, будут иметь гораздо больший “репликативный возраст”, чем клетки в момент посева, так что дальнейшие их изменения могут определяться не только интересующим нас “стационарным старением”. По тем же причинам ста-

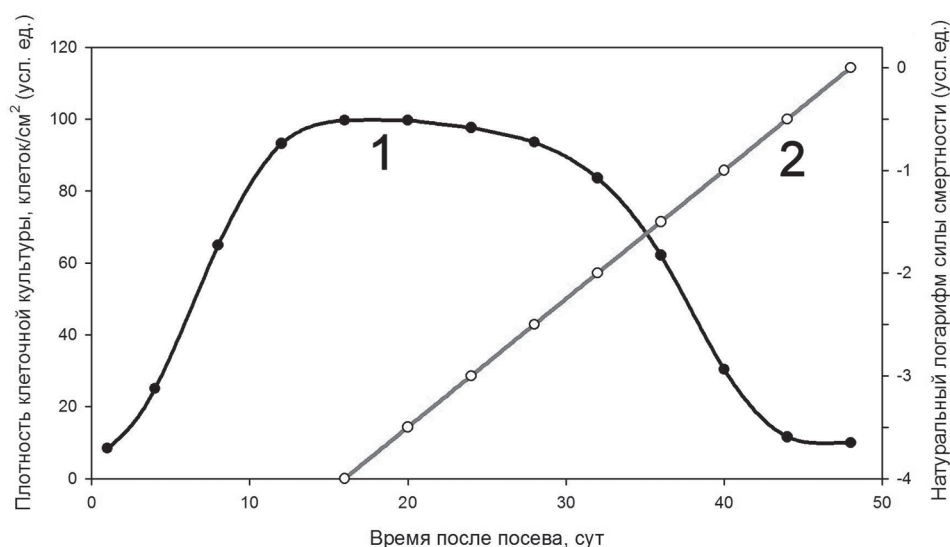


Рис. 2. Схематическое изображение кинетики роста и гибели непересеваемой культуры клеток. Показана зависимость плотности живых клеток (1) и натурального логарифма смертности клеток (2) от времени после посева

новятся проблематичными корректные повторы экспериментов (нормальные клетки в массовой культуре непрерывно изменяются со временем). Наконец, часто мы проводим так называемые “поперечные” (cross-sectional) эксперименты, в которых клетки засеваются в культуральные флаконы через определенные (иногда достаточно большие) интервалы времени, а используются для оценки изучаемых показателей в один конкретный момент, когда у групп флаконов разный “стационарный возраст”. Если работать на нормальных фибробластах, “считающих” пассаж, то обеспечить идентичность всех групп посеянных клеток практически невозможно. В данном случае, как говорится, “нельзя войти в одну реку дважды” [37, 38].

Не исключено, что “объединенная” клеточно-кинетическая модель, включающая в себя все участки кривой роста и последующей гибели клеток в стационарной фазе роста, позволит пролить дополнительный свет на давно известную (еще с XVIII века) взаимосвязь длительности периода развития млекопитающих и их максимальной продолжительности жизни (см., например, [39–41]). Как и у высших животных, в нашей модели сначала клетки очень быстро размножаются (“эмбриональное развитие”), потом средняя скорость пролиферации многократно снижается вплоть до прекращения изменения численности клеточной популяции (“завершение развития организма”), а затем начинается вымирание неделящихся клеток (“старение взрослого организма”). Модификация с помощью тех или иных способов начальной части кривой, как оказалось, с необходимостью влечет за собой и из-

менение ее второй части, описывающей старение и гибель клеток.

В заключение хотелось бы отметить следующее. К сожалению, насколько мне известно, подавляющее большинство работ, направленных на изучение взаимосвязи кинетики пролиферации культивируемых клеток животных и человека со старением, были выполнены в 70–80-е годы прошлого века. В то же время, мне кажется, что “клеточно-кинетический” подход к экспериментально-геронтологическим исследованиям незаслуженно утратил внимание специалистов в последние годы и требует “реанимации”. При этом, естественно, необходимо дальнейшее развитие упомянутых моделей, в частности — в плане разработки соответствующего математического аппарата, который мог бы не только пролить свет на некоторые закономерности старения многоклеточных организмов, но и улучшить эффективность поиска новых геропротекторов. Что же касается упомянутой проблемы выбора оптимальных объектов для такого рода исследований, то мне представляются наиболее перспективными в этом плане нормальные иммортализованные клетки человека [42]. Они не являются раковыми, но обладают неограниченным митотическим потенциалом. Именно на таких клетках в ближайшее время мы и планируем проводить наши эксперименты.

Автор благодарен Г.В. Моргуновой и А.А. Клебанову за помощь в подготовке рукописи статьи.

Работа выполнена в рамках государственного задания МГУ, ч. 2 (фундаментальные научные исследования, № AAAA-A16-116021660098-8).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schneider E.L., Smith J.R. The relationship of *in vitro* studies to *in vivo* human aging // Int. Rev. Cytol. 1981. Vol. 69. P. 261–270.

2. Gazzola G.C., Bussolati O., Longo N., Dall'Asta V., Franchi-Gazzola R., Guidotti G.G. Effect of *in vitro* ageing on the transport of neutral amino acids in human fibroblasts //

Cellular ageing. Monographs in developmental biology, vol. 17 / Ed. H.W. Sauer. Basel-N.Y.: S. Karger, 1984. P. 234–244.

3. Macieira-Coelho A., Loria E., Berumen L. Relationship between cell kinetic changes and metabolic events during cell senescence *in vitro* // Cell impairment in aging and development / Eds V.J. Cristofalo and E. Holečková. N.Y.-London: Plenum Press, 1975. P. 51–65.

4. Macieira-Coelho A. Kinetics of the proliferation of human fibroblasts during their lifespan *in vitro* // Mech. Ageing Dev. 1977. Vol. 6. N 5. P. 341–343.

5. Ohashi M., Aizawa S., Ooka H., Ohsawa T., Kaji K., Kondo H., Kobayashi T., Noumura T., Matsuo M., Mitsui Y., Murota S., Yamamoto K., Ito H., Shimada H., Utakoji T. A new human diploid cell strain, TIG-1, for the research on cellular aging // Exp. Gerontol. 1980. Vol. 15. N 2. P. 121–133.

6. Wasiko B.M., Carr D.T., Tung H. et al. Buffering the pH of the culture medium does not extend yeast replicative lifespan // F1000Research. 2013. Vol. 2:216.

7. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Marotta F., Khokhlov A.N. Culture medium pH and stationary phase/chronological aging of different cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 2. P. 47–51.

8. Чиркова Е.Ю., Головина М.Э., Наджарян Т.Л., Хохлов А.Н. Клеточно-кинетическая модель для изучения геропротекторов и геропромоторов // Докл. АН СССР. 1984. Т. 278. N 6. С. 1474–1476.

9. Хохлов А.Н., Головина М.Э., Чиркова Е.Ю., Наджарян Т.Л. Анализ некоторых кинетических закономерностей роста культивируемых клеток. I. Модель // Цитология. 1985. Т. 27. N 8. С. 960–965.

10. Khokhlov A.N. The cell kinetics model for determination of organism biological age and for geroprotectors or geropromoters studies // Biomarkers of aging: expression and regulation. Proceeding / Ed. F. Licastro and C.M. Caldarera. Bologna: CLUEB, 1992. P. 209–216.

11. Конев С.В., Мажуль В.М. Межклеточные контакты. Минск: Наука и техника, 1977. 312 с.

12. Kondo H., Kasuga H., Noumura T. Effects of various steroids on *in vitro* lifespan and cell growth of human fetal lung fibroblasts (WI-38) // Mech. Ageing Dev. 1983. Vol. 21. N 3–4. P. 335–344.

13. Macieira-Coelho A. Action of cortisone on human fibroblasts *in vitro* // Experientia. 1966. Vol. 22. N 6. P. 390–391.

14. Grünwald J., Mey J., Schönleben W., Hauss J., Hauss W.H. Cultivated human arterial smooth muscle cells. The effect of donor age, blood pressure, diabetes and smoking on *in vitro* cell growth // Pathol. Biol. (Paris). 1983. Vol. 31. N 10. P. 819–823.

15. Хохлов А.Н. Пролиферация и старение // Итоги науки и техники ВИНТИ АН СССР, серия “Общие проблемы физико-химической биологии”. Т. 9. М.: ВИНТИ, 1988. 176 с.

16. Khokhlov A.N. Cyto gerontology at the beginning of the third millennium: from “correlative” to “gist” models // Russ. J. Dev. Biol. 2003. Vol. 34. N 5. P. 321–326.

17. Morgunova G.V., Kolesnikov A.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Senescence-associated  $\beta$ -galactosidase – a biomarker of aging, DNA damage, or cell proliferation restriction? // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 4. P. 165–167.

18. Khokhlov A.N. Stationary cell cultures as a tool for gerontological studies // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1992. Vol. 663. P. 475–476.

19. Khokhlov A.N. Cell proliferation restriction: is it the primary cause of aging? // Ann. N.Y. Acad. Sci. 1998. Vol. 854. P. 519.

20. Khokhlov A.N. From Carrel to Hayflick and back, or what we got from the 100-year cyto gerontological studies // Biophysics. 2010. Vol. 55. N 5. P. 859–864.

21. Khokhlov A.N. Does aging need its own program, or is the program of development quite sufficient for it? Stationary cell cultures as a tool to search for anti-aging factors // Curr. Aging Sci. 2013. Vol. 6. N 1. P. 14–20.

22. Khokhlov A.N. Impairment of regeneration in aging: appropriateness or stochasticity? // Biogerontology. 2013. Vol. 14. N 6. P. 703–708.

23. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Does aging have a purpose? // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2017. Vol. 72. N 4. P. 222–224.

24. Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., Khokhlov A.N. Protein poly(ADP-ribosylation) system: Changes in development and aging as well as due to restriction of cell proliferation // Biochemistry (Moscow). 2017. Vol. 82. N 11. P. 1391–1401.

25. Fabrizio P., Longo V.D. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae* // Aging Cell. 2003. Vol. 2. N 2. P. 73–81.

26. Nyström T. Stationary-phase physiology // Annu. Rev. Microbiol. 2004. Vol. 58. P. 161–181.

27. Khokhlov A.N. Which aging in yeast is “true”? // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 1. P. 11–13.

28. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Some remarks on the relationship between autophagy, cell aging, and cell proliferation restriction // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 4. P. 207–211.

29. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Karmushakov A.F., Shilovsky G.A., Nasonov M.M., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: choosing the correct model system // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2014. Vol. 69. N 1. P. 10–14.

30. Alinkina E.S., Vorobyova A.K., Misharina T.A., Fatkullina L.D., Burlakova E.B., Khokhlov A.N. Cyto gerontological studies of biological activity of oregano essential oil // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2012. Vol. 67. N 2. P. 52–57.

31. Yablonskaya O.I., Ryndina T.S., Voeikov V.L., Khokhlov A.N. A paradoxical effect of hydrated C<sub>60</sub>-fullerene at an ultralow concentration on the viability and aging of cultured Chinese hamster cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2013. Vol. 68. N 2. P. 63–68.

32. Khokhlov A.N., Morgunova G.V., Ryndina T.S., Coll F. Pilot study of a potential geroprotector, “Quinton Marine Plasma”, in experiments on cultured cells // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 1. P. 7–11.

33. Morgunova G.V., Klebanov A.A. Impairment of the viability of transformed Chinese hamster cells in a nonsubcultured culture under the influence of exogenous oxidized guanosine is manifested only in the stationary phase of growth // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 3. P. 124–129.

34. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. On the constructing of survival curves for cultured cells in cyto gerontological experiments: a brief note with three hierarchy diagrams // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. Vol. 70. N 2. P. 67–71.

35. Morgunova G.V., Klebanov A.A., Khokhlov A.N. Interpretation of data about the impact of biologically active compounds on viability of cultured cells of various origin from a gerontological point of view // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. Vol. 71. N 2. P. 67–70.

36. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. On choosing control objects in experimental gerontological research // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2018. Vol. 73. N 2. P. 59–62.

37. Khokhlov A.N., Morgunova G.V. Testing of geroprotectors in experiments on cell cultures: pros and cons // *Anti-aging drugs: From basic research to clinical practice* / Ed. A.M. Vaiserman. Royal Society of Chemistry, 2017. P. 53–74.
38. Khokhlov A.N., Klebanov A.A., Morgunova G.V. Anti-aging drug discovery in experimental gerontological studies: from organism to cell and back // *Aging: Exploring a complex phenomenon* / Ed. Sh.I. Ahmad. Boca Raton: Taylor & Francis, 2018. P. 577–595.
39. Charnov E.L. On evolution of age of maturity and the adult lifespan // *J. Evol. Biol.* 1990. Vol. 3. N 1–2. P. 139–144.
40. Charnov E.L., Berrigan D. Dimensionless numbers and life history evolution: age of maturity versus the adult lifespan // *Evol. Ecol.* 1990. Vol. 4. N 3. P. 273–275.
41. de Magalhães J.P., Costa J., Church G.M. An analysis of the relationship between metabolism, developmental schedules, and longevity using phylogenetic independent contrasts // *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2007. Vol. 62. N 2. P. 149–160.
42. Bodnar A.G., Ouellette M., Frolkis M., Holt S.E., Chiu C.P., Morin G.B., Harley C.B., Shay J.W., Lichtsteiner S., Wright W.E. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells // *Science*. 1998. Vol. 279. N 5349. P. 349–352.

Поступила в редакцию  
17.07.2018

Принята в печать  
02.09.2018

## EDITORIAL

### CELL KINETIC APPROACHES TO THE SEARCH FOR ANTI-AGING DRUGS: THIRTY YEARS AFTER

*A.N. Khokhlov*

*Evolutionary Cytoogerontology Sector, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia  
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru*

A brief overview of the ideas of the possibility of using the cell kinetic model developed by the author in the 1980s to test, in experiments on cell cultures, potential geroprotectors and geropromoters, which slow down or accelerate, respectively, the aging of animals and humans. The process of the evolution of this model is considered — from the estimation of only the cell reproduction rate and saturation density in a non-subcultured cell culture to the constructing of survival curves in the stationary phase of growth, and further — to an analysis of the possible interrelation between all parts of the curve of cells' growth and subsequent dying out. Possible approaches to mathematical and statistical analysis of the data obtained within the framework of this model system are analyzed. It is emphasized that such studies can be carried out on cells of very different nature (normal and transformed human and animal cells, plant cells, yeast, mycoplasmas, bacteria, etc.), which makes possible an evolutionary approach to the interpretation of the results obtained. At the same time, in the author's opinion, the most promising experiments are those carried out on immortalized cells of humans and animals, since they are not cancerous on the one hand, and on the other have an unlimited mitotic potential and, therefore, do not "age" in the process of numerous divisions, as, for example, normal human diploid fibroblasts do. It is assumed that the appropriate mathematical analysis of the entire growth and dying out curve of a non-subcultured cell culture (from seeding into a culture flask to the complete death of all cells) may allow us to clarify certain relationships between the development and aging of a multicellular organism, and to increase the reliability of identifying promising geroprotectors.

**Keywords:** *aging, cell cultures, geroprotectors, geropromoters, cell proliferation, stationary phase aging, kinetics, test systems, review*

#### Сведения об авторе

*Хохлов Александр Николаевич* — докт. биол. наук, зав. сектором эволюционной цитогеронтологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-15-90;  
e-mail: khokhlov@mail.bio.msu.ru

## ОБЗОР

УДК 575::612.089/616.529.1-08

МЕТОДЫ ГЕННОЙ ТЕРАПИИ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ВРОЖДЕННОГО  
БУЛЛЕЗНОГО ЭПИДЕРМОЛИЗА

А.К. Бейлин, Н.Г. Гурская\*, Е.А. Воротеляк

Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова, Россия, 119334, г. Москва, ул. Вавилова, д. 26;  
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова Минздрава России,  
117997, г. Москва, ул. Островитянова, д. 1

\* e-mail: ngurskaya@mail.ru

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это гетерогенная группа редких генодерматозов, характеризующаяся повышенной “ранимостью” кожи, проявляющейся как образование пузырей и незаживающих эрозий на коже и слизистых оболочках внутренних органов при незначительных механических воздействиях. Выделяют три основных типа ВБЭ: простой, пограничный и дистрофический буллезные эпидермолизы, каждый из которых вызывается мутациями в генах, кодирующих соответственно белки эпидермиса, зоны базальной мембраны или дермы; отдельно выделяют — четвертый тип ВБЭ — гемидесмосомный или синдром Киндлер, при котором мутации повреждают ген *FERMT1*, кодирующий белок киндлин-1. Существующие подходы, призванные улучшить состояние больных ВБЭ, находятся на разных стадиях разработки: часть из них уже используют в клинике, для других еще проводятся лабораторные исследования. В зависимости от типа ВБЭ и характера наследования мутации применяются различные стратегии генетической терапии: от заместительной генной терапии с помощью вирусной экспрессии до редактирования генома с помощью программируемых синтетических нуклеаз. Накопленный опыт клеточной терапии по аллогенным и аутологическим пересадкам в сочетании с генной терапией позволяет создать новые подходы к функциональной терапии ВБЭ *ex vivo*.

**Ключевые слова:** врожденный буллезный эпидермолиз, кожа человека, эпидермальные стволовые клетки, генная терапия, ретровирус, редактирование генома, CRISPR/Cas9, TALEN, обзор

Врожденный буллезный эпидермолиз (ВБЭ) — это гетерогенная группа редких генодерматозов, при которых наблюдается высокая чувствительность к небольшим механическим воздействиям. Клинически заболевание проявляется в виде появления пузырей и эрозий, возникающих на коже и слизистых оболочках после незначительной травмы или даже без нее. Эти поражения возникают вследствие генетически обусловленных дефектов структурных белков кожи, обеспечивающих интраэпидермальные или дермоэпидермальные связи [1]. К основным типам ВБЭ относят простой буллезный эпидермолиз (ПБЭ), пограничный буллезный эпидермолиз (ПоБЭ) и дистрофический буллезный эпидермолиз (ДБЭ); последний подразделяется на доминантный ДБЭ (ДДБЭ) и рецессивный ДБЭ (РДБЭ). Отдельно выделяют синдром Киндлер [2].

Для каждого из типов болезни были выявлены гены, мутации в которых ответственны за приобретение фенотипа ВБЭ. В настоящее время известно как минимум 18 генов структурных белков кожи и более 1000 мутаций в них, ассоциированных с развитием клинических проявлений того или иного типа ВБЭ [3–5]. Для обеих форм ДБЭ — это повреждения гена *COL7A1*, кодирующего кол-

лаген VII типа (C7), для ПоБЭ — это мутации генов, вовлеченных в образование ламинина 322 и интегрин  $\alpha\beta 4$ , а также гена *COL17A1*, для ПБЭ — повреждения генов *KRT5* и *KRT14*, а также *PLEC*.

Эффективной терапии больные ВБЭ не получают в силу генетической природы данного заболевания [6]. Однако в настоящее время появляются методы, позволяющие подойти ближе к решению вопроса об эффективном и доступном лечении ВБЭ [7]. Основные исследуемые варианты терапии ВБЭ можно условно разделить на две группы стратегий — *ex vivo* и *in vivo*. В данном обзоре основное внимание уделено методам, лежащим в основе стратегии *ex vivo*, основанной на сочетании генной и клеточной терапии. Данная стратегия включает в себя культивирование первичных клеточных линий, полученных из биоптатов кожи больного, генетическую коррекцию культивируемых клеток и аутологичную трансплантацию трансгенного эквивалента кожи. Важным условием успеха функциональной терапии является наличие в первичных культурах эпидермальных стволовых клеток, поскольку генетическая коррекция этих клеток имеет решающее значение для обеспечения длительного терапевтического эффекта от аутоло-

гической трансплантации. Получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) из соматических дифференцированных клеток кожи больных обеспечивает неограниченный ресурс для последующей генетической модификации, дифференцировки и пополнения популяции генетически скорректированных клеток. Генетическая терапия аутологичных клеток пациентов с ВБЭ может быть выполнена с помощью разных методов. Наиболее перспективные из них — замещение гена с помощью вирусов, редактирование генов с помощью программируемых нуклеаз и РНК-терапия. Коррекция мутаций предполагает доставку экзогенной кассеты, модифицирующей ген, в клетки-мишени. Низкая эффективность доставки генетического материала в клетки является важным фактором, ограничивающим эффективность методов функциональной терапии *ex vivo*. По способу доставки методы делятся на группы, использующие вирусные системы и невирусные искусственные векторные системы.

### Вирусные стратегии

Исторически первым был метод замещения гена [7, 8]. В этом случае проводилась трансдукция ретровирусом MLV (Mouse Leukemia Virus — вирус лейкемии мышей), в котором экспрессия целевого гена находилась под контролем LTRs (Long Terminal Repeats — длинные концевые повторы) промотора вируса. В первой работе этого цикла у больного с ПоБЭ была выявлена гетерозиготная мутация в гене *LAMB3*, кодирующем субъединицу ламинина 332. Мутация приводит к отсутствию экспрессии этого белка, нарушению дермально-эпидермального соединения и структуры компонентов базальной мембраны. Для генетической коррекции культивировали эпидермальные стволовые клетки и кератиноциты из биопсии кожи больного, после чего проводили ретровирусную трансдукцию вектором, содержащим полноразмерную копию кДНК (комплементарная ДНК) гена *LAMB3*. Трансдуцированные клетки культивировали *in vitro*, выращивали эпидермальный слой и полученный аутологичный кожный эквивалент пересаживали больному. Последующий анализ его тканей показал наличие экспрессии ламинина 332 и восстановление адгезивных свойств клеток в области пересадки. Наблюдение в течение 6 лет показало отсутствие симптомов ПоБЭ — на коже не наблюдалось ни эрозий, ни пузырей, не было воспаления и иммунного ответа на пересадку. Важное достижение в области функциональной терапии ВБЭ было сделано в лаборатории Мишеля де Люка [9]. Мальчику 7 лет, страдающему ПоБЭ, провели серию аутологичных трансплантаций кожных эквивалентов, состоящих в основном из кератиноцитов после трансдукции (ретровирусный вектор с кДНК *LAMB3* был таким же, как описано выше), причем пересадке подвергли практически всю поверхность кожи

ребенка (0,85 м<sup>2</sup>). В течение 3 лет в генетически скорректированных кератиноцитах поддерживалась экспрессия ламинина, при этом не обнаруживались патологические пузыри на коже по всей поверхности тела пациента. В совокупности работы по функциональной терапии ПоБЭ показали, что пересадки генетически скорректированных аутологичных кератиноцитов (среди которых есть эпидермальные стволовые клетки кожи) позволяют получить долгоживущий, функциональный и самообновляющийся трансгенный эпидермис, способный убрать клинические проявления ПоБЭ как минимум на несколько лет.

К сожалению, использование стратегии замещения гена с помощью ретровирусной трансдукции не дало столь положительного эффекта в случае функциональной терапии ДБЭ, где четырем пациентам, страдающим тяжелой формой РДБЭ, сопровождающейся отсутствием синтеза коллагена VII типа, были проведены аутологические трансплантации трансгенных кожных эквивалентов [8]. Ретровирусный вектор содержал полноразмерную копию кДНК гена *COL7A1*. Было показано, что в трансплантируемых кератиноцитах восстанавливается синтез и секреция полноразмерного белка коллагена VII типа. С7 образуется в результате серии посттрансляционных модификаций, секреции и последующего процессинга во внеклеточном матриксе. В коже человека С7 формирует основу фибриллярной части внеклеточного матрикса дермы — прикрепляющие фибриллы папиллярного слоя дермы, в коже больных с РДБЭ прикрепляющие фибриллы не образуются, нарушается структура дермо-эпидермального соединения и возникают пузыри. После пересадки трансгенного эпидермиса в коже больных РДБЭ наблюдалось образование прикрепляющих фибрилл, исчезли раны и пузыри в зонах трансплантации, ткани стали более устойчивыми к механическому воздействию. Однако эффект оказался временным, уже через 6 мес. после трансплантации экспрессия белка снизилась, а через год у всех пациентов вернулись и симптомы заболевания.

Столь разный эффект от заместительной генной терапии и аутологической трансплантации диктует необходимость изучения факторов, определяющих механизмы поддержания эффективности трансплантатов. Сипрашвили и соавт. предполагают, что отличия в эффективности пересадок в случае ПоБЭ и РДБЭ объясняются разным количеством эпидермальных стволовых клеток в трансплантатах, острый недостаток которых наблюдался у больных с ДБЭ [8]. Недостаточное количество стволовых клеток, доступных для пересадок, является фактором, ограничивающим успешность не только генной терапии кератиноцитов, но и аллогенных трансплантаций костного мозга [10]. Секреция ламинина 332 влияет на клетки, которые его продуцируют, стимулируя их адгезию, и создает преимущество в росте для генетически скорректированных клеток.

В случае терапии РДБЭ клетки восстанавливают секрецию структурного белка С7, не связанного непосредственно с системой ростовых факторов, но никаких преимуществ в росте генетически модифицированные клетки не получают. Основное внимание в работах по заместительной генной терапии было сосредоточено на процессе целевой экспрессии корректированного гена без оценки функциональности белкового трансгенного продукта. Данные экспериментов по ретровирусной генной терапии свидетельствуют о необходимости изучения данного вопроса перед введением биомедицинского клеточного продукта в клиническую практику. Для генетической коррекции ВБЭ используются также лентивирусы, способные заражать как делящиеся, так и неделящиеся клетки.

Поскольку ретровирусы интегрируются в активно транскрибируемые участки ДНК, то использование векторов на их основе потенциально может привести к опухолеобразованию, так как возможны изменение экспрессии и активация неизвестных промоторных областей. Успех данной терапевтической стратегии замещения гена объясняется тем, что в клинической практике после восстановления функций поврежденного белка у больных ВБЭ не было отмечено случаев возникновения иммунного ответа на пересадку, не было обнаружено онкологических трансформаций.

#### *Использование неинтегрируемых вирусных систем*

Этот подход основан на применении аденоассоциированных вирусных векторов (AAV — Adeno-Associated Viruses), при использовании которых риск мутагенеза, опосредованного случайным встраиванием определенных элементов в геном, снижен. Для эффективной трансфекции первичных кератиноцитов человека применяют вирусную систему AAV на основе серотипов 2, 6 и 8 [11]. Например, трансдукция AAV использовалась для генной терапии ПБЭ, проводили коррекцию мутации в *KRT14*, вызывающей тяжелую форму ПБЭ — подтип Доулинг-Меара (Dowling-Meara type epidermolysis bullosa simplex). Эпидермальные стволовые клетки больного были подвергнуты успешной трансдукции AAV серотипа 6. Миссенс-мутация в *KRT14*, приводящая к замене аргинина 125 на цистеин в цитокератине 14, имеет доминантно-негативный характер проявления, в таких случаях нокаут мутантного аллеля в клетках больного может привести к появлению белка с нормальной функцией за счет работы второго, не мутантного, аллеля. В последовательность 3-го экзона *KRT14* вносили нуклеотидную последовательность зеленого флуоресцентного белка под контролем IRES (Internal Ribosome Entry Site — участок внутренней посадки рибосомы). На проточном цитофлуориметре отбирались клетки, по зеленой флуоресценции которых можно было выявить процесс инсерции и разрушения

рамки считывания мутантного гена *KRT14*, в результате чего отбирались клоны с “выключенной” экспрессией мутантного аллеля *KRT14* [12]. Пересадка генетически скорректированных кожных эквивалентов иммунодефицитным мышам прошла успешно, и дальнейшие исследования продемонстрировали, что пересаженный эпидермальный слой имеет нормальную структуру. Авторы отмечают, что кожный эквивалент, полученный из отдельной клетки, состоял из  $10^{13}$  клеток, в работе подчеркивается возможность использования пролиферативного потенциала одной стволовой клетки для наработки функционального эпидермального эквивалента, достаточного для пересадок на большие поверхности кожи.

Успешное использование векторов на основе аденоассоциированных вирусов для функциональной терапии ДБЭ было продемонстрировано Чаморро с соавт. на кератиноцитах больного, в этой работе была произведена коррекция специфической мутации в гене *COL7A1* [13]. Системы на основе AAV используются при генной терапии кератиноцитов в качестве донорных матриц для гомологической рекомбинации (см. ниже), поскольку в результате вирусной трансдукции в клетке синтезируются одноцепочечные молекулы ДНК, увеличивающие эффективность гомологичной рекомбинации [14]. Интересный методический подход к генетической терапии гена *LAMA3* с помощью AAV представлен в статье Мело с соавт. [15]. Был получен новый серотип вируса AAV с высокой активностью рекомбинации — AAV-DJ, при помощи которого происходила эффективная генетическая коррекция в кератиноцитах. Вектор AAV содержал фрагмент гена *LAMA3* дикого типа с экзонами 43 и 44. Мутантный аллель данного гена больного ребенка с ПоБЭ содержал сбой рамки считывания и предварительный стоп-кодон (ПСК) в экзоне 45, в клетках происходила деградация мРНК мутантного гена *LAMA3*, в результате белок ламинин не синтезировался. Деградация молекул мРНК, несущих ПСК, происходит в клетках за счет работы системы NMD (нонсенс-опосредованной деградации мРНК, от англ. NMD — Nonsense Mediated Decay). В данном случае при экспрессии с вирусной кассеты восстанавливалась открытая рамка считывания, что в итоге, после гомологичной рекомбинации, приводило к появлению немутантного *LAMA3* и синтезу функционального белка, ламинина- $\alpha 3$ , являющегося субъединицей гетеротримерного ламинина 332. Важной особенностью работы являлась стратегия функционального положительного отбора и селективной наработки целевых клеток, которые приобретали способность к адгезии и росту за счет восстановленной функции ламинина 332. Вирусные стратегии генной терапии имеют преимущества, связанные с хорошей эффективностью доставки генетического материала в клетки и способностью заражать различные типы клеток, но обладают существенным ограничением

в емкости векторов, что исключает их использование для коррекции длинных генетических последовательностей.

### Невирусные стратегии генной терапии

Основным преимуществом трансфекций невирусными векторами является более безопасный профиль интеграции, низкая токсичность и низкая иммуногенность не содержащих вирусные последовательности векторов [16]. Однако эффективность доставки экзогенной генетической кассеты в клетки ограничена эффективностью трансфекции, которая, как правило, для таких клеток, как кератиноциты человека, является низкой. Этот недостаток преодолевается селективным отбором трансфицированных клеток с помощью дополнительных инструментов. Для этого в плазмиды, несущие фрагменты последовательности корректируемых генов без мутаций, встраивают гены флуоресцентных маркеров или гены устойчивости к антибиотикам. После трансфекции клеток плазмидами отбирают клоны с помощью проточной цитофлуориметрии или по способности роста на селективной среде.

С началом нового периода в генной терапии — использованием программируемых синтетических нуклеаз для редактирования генома — важным этапом стало увеличение эффективности временной трансфекции, с помощью которой осуществляют доставку нуклеазной системы в клетки, а получение трансгенных линий клеток с постоянной экспрессией перестало быть столь актуальной задачей [17].

### Стратегии редактирования геномов

С развитием технологии направленных воздействий на геном клетки область функциональной генной терапии стала развиваться очень быстро. Активность синтетических нуклеаз можно специфически “запрограммировать” или направить на необратимое изменение нуклеотидной последовательности гена в области мутации (ДНК-мишени), причем направленное изменение последовательности будет достигаться без интеграции провирусных или каких-либо других дополнительных последовательностей. Для редактирования геномов используются синтетические нуклеазы: домены цинковых пальцев (ZFN — Zinc Finger Nuclease), TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases — эффекторные нуклеазы, подобные транскрипционным активаторам), домены и системы CRISPR/Cas (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/Crispr-Associated protein — регулярно расположенные кластеры коротких палиндромных повторов/белок, ассоциированный с этими повторами), с помощью которых можно нокаутить целевой ген или заменить его для восстановления функции белка [18]. Основными преимуществами данной технологии является возможность наце-

лить данную систему на любую последовательность в геноме с сохранением эндогенных промоторов для экспрессии гена.

TALEN — это химерные белки, которые состоят из нуклеазного домена и ДНК-связывающего TALE-домена — транскрипционного фактора, ведущего свое происхождение от растительного патогена. Каждый ДНК-связывающий домен состоит из расположенных тандемно 35 аминокислотных повторов, а каждый такой повтор, в свою очередь, узнает только один нуклеотид в большой бороздке ДНК. Таким образом набор TALE-доменов узнает уникальную последовательность ДНК длиной 20 нуклеотидов. Эта синтетическая система способна специфически узнавать любую последовательность ДНК. Недостатки TALEN-доменов заключаются в трудоемкости и сложности их клонирования. При необходимости изменить последовательность для редактирования на другую нужно полностью изменить дизайн TALE и клонировать *de novo* всю химерную молекулу TALEN [19, 20].

В отличие от функционирования белков TALEN действие системы CRISPR/Cas направляется некодирующей РНК. CRISPR — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами и разделенные уникальными последовательностями (спейсерами), Cas — нуклеаза, разрезающая чужеродную ДНК, специфичность такого разрезания определяется короткими некодирующими РНК, узнающими и связывающими последовательность ДНК-мишени. Название системы отражает ее прокариотическое происхождение, это часть иммунной системы прокариот, насчитывающая несколько похожих семейств. Самое широкое применение на сегодня имеет белок Cas9 (или spCas9, поскольку белок выделен из *Streptococcus pyogenes*), CRISPR/Cas9 относится ко II типу CRISPR-систем, в которых CRISPR-участки транскрибируются, процессируются и в соединении с транс-активирующей РНК crRNA (tracrRNA) образуют так называемую направляющую РНК (guide RNA), которая, комплементарно взаимодействует с целевым фрагментом ДНК, осуществляя узнавание ДНК-мишени. Связавшись с ДНК, эти РНК взаимодействуют с Cas9-нуклеазой, которая конформационно перестраивается и активируется для разрезания ДНК [21]. Необходимым элементом системы является наличие в ДНК трехнуклеотидного ПАМ-мотива (ПАМ — прилегающий к протоспейсеру участок последовательности ДНК, от англ. PAM — Protospacer Adjacent Motive), имеющего структуру 5'-NGG-3', где N — любой нуклеотид. ПАМ должен находиться в ДНК рядом с участком узнавания направляющей РНК. Активированная Cas9 разрезает ДНК примерно в 4 нуклеотидах от ПАМ, образуя двухпочечный разрыв. Нуклеазная система CRISPR/Cas9 не требует дизайна *de novo* белка для узнавания каждой новой мишени. Необходимо лишь подобрать последовательность,

содержащую ПАМ, и синтезировать специфическую направляющую РНК.

Важной особенностью и недостатком системы CRISPR/Cas является ее нецелевая активность, когда направляющая РНК отжигается неспецифически и способствует разрезанию другой последовательности, часто локализованной в другом гене, на другой хромосоме. Эта активность может явиться причиной летальных изменений физиологии редактируемой клетки [22]. Существует несколько десятков программ и онлайн-ресурсов, позволяющих предсказать эффективность, специфичность и неспецифическую активность направляющих РНК [23]. Основная задача после проведения редактирования заключается в отборе таких клеток, в которых прошел процесс специфического редактирования, но нет неспецифических мутаций в других последовательностях [20]. Для получения трансгенных эпидермальных клеточных эквивалентов, пригодных для аутологичной трансплантации больным, могут быть использованы только отредактированные клетки, проверенные с помощью полногеномного секвенирования.

Кроме Cas9, в работах по редактированию генома используются разные мутантные варианты этого белка: Cas9n D10A [24]; BE-HF1,2,4; FokI-dCas9; espCas9 [25]; Нура-Cas9 [26], а также другие системы, например, Cpf1 (CRISPR/Cas12, система V-типа, выделенная из *Streptococcus aureus*), использующие другую последовательность нуклеотидов ПАМ.

Механизм действия синтетических нуклеаз сводится к образованию двухцепочечных разрывов в геномной ДНК, которые затем репарируются в клетке с помощью, в основном, двух различных механизмов: негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ – Non-Homologous End Joining) и гомологичной рекомбинации (HDR – Homology Directed Repair) [17]. NHEJ приводит к накоплению инсерций и делеций в клетке, часто – к сбою рамки считывания. Это самый простой и эффективный способ редактирования гена, при котором мутации в различных локусах аллеля могут быть выключены за счет работы одной запрограммированной нуклеазы. Данный путь репарации часто создает “нокаутные” мутанты целевого гена [19]. Гомологичная рекомбинация приводит к замене последовательности ДНК с мутацией в геноме на последовательность дикого типа. Частота спонтанной HDR в клетках значительно меньше чем NHEJ, гомологичная рекомбинация проходит в клетках только на определенных стадиях клеточного цикла: в конце фазы синтеза (S-фазы) и в постсинтетической фазе (G2-фазе). Из-за этого эффективность исправления мутаций с помощью гомологичной рекомбинации невысока. Для процесса исправления мутации необходимо присутствие в клетке экзогенной донорной последовательности ДНК, причем в значительных количествах (донорная последовательность может быть в виде одноцепо-

точного фрагмента ДНК и в виде плазмидной ДНК). Донорная плазида должна содержать исправленный вариант мутации, окруженный последовательностями (от 200 до 1000 нуклеотидов), так называемыми “плечами гомологии”.

В первой работе TALEN-опосредованное редактирование гена было осуществлено на клетках больного с диагнозом РДБЭ, когда посредством гомологичной рекомбинации устранили ПСК в гене *COL7A1* [27]. В фибробластах больного после геномного редактирования появилась экспрессия С7, но поскольку первичные клетки имеют ограниченную продолжительность жизни, авторы получили изогенные иПСК из клеток после генетической коррекции, проверив затем отредактированные иПСК на мышах *in vivo*, они получили кожные тератомные модели из прошедших редактирование клеток. В следующей работе по генетическому редактированию гена *COL7A1*, о которой уже говорилось выше при описании системы AAV, для коррекции ПСК использовали оба механизма репарации – NHEJ и HDR [13]. Изучаемая мутация c6527insC часто встречается в Испании у больных с диагнозом РДБЭ и приводит к появлению ПСК. Для доставки нуклеазной системы TALEN и донорной ДНК использовали AAV-систему, о которой уже говорилось выше. С помощью HDR были получены отдельные клоны с экспрессией С7 на физиологическом уровне. Воздействие TALEN на геномную ДНК без донорной последовательности привело к образованию набора делеций и инсерций, в том числе в ряде случаев произошло нарушение рамки считывания, в результате удалось найти и отобрать несколько клонов с восстановленной открытой рамкой считывания *COL7A1*. В обоих случаях (NHEJ- и HDR-опосредованной репарации) были выявлены синтез С7 и образование структур, похожих на прикрепляющие фибриллы человека, при пересадке трансгенных эпидермальных эквивалентов кожи иммунодефицитным мышам.

В работе Шинкума с соавт. использовалось редактирование гена для нокаута гетерозиготной мутации в экзоне 109 *COL7A1*, вызывающей ДДБЭ [28]. Эта мутация приводила к делеции 15 п.о., образующийся продукт транслировался в рамке считывания *COL7A1* и формировал нефункциональный тример С7. Редактирование проводили на иПСК, полученных из первичных фибробластов человека, несущих мутацию. Редактирование фрагмента гена *COL7A1* осуществлялось по механизму негомологичной рекомбинации NHEJ с помощью TALEN-нуклеазы и параллельно – с помощью системы CRISPR/Cas9. Оказалось, что система CRISPR/Cas9 осуществляет редактирование приблизительно в 2–3 раза эффективнее, поэтому далее для работы на иПСК использовали только CRISPR/Cas9. При трансфекции иПСК использовали смесь плазмид – первая кодировала spCas9, вторая – направляющую РНК, в каждой плазмиде

содержались кДНК одного из генов флуоресцентных репортеров с эмиссией в зеленой или в красной области спектра (для последующего отбора трансфицированных клеток на проточном цитофлуориметре). Были отобраны четыре клона с мутациями, сдвигающими рамку считывания мутантного аллеля. Эта мутация приводила к появлению ПСК, и ожидалось, что произойдет деградация мРНК за счет работы механизма NMD, однако количество мРНК не снизилось, синтезировался укороченный белок. Подобное явление было описано ранее для другой мутации с появлением ПСК в гене *COL7A1*, также не приводящей к деградации мРНК по непонятным причинам [29]. Полученный в результате геномного редактирования укороченный белок не взаимодействовал с нормальным белком С7 и не был способен к тримеризации, то есть этот продукт являлся менее токсичным для клетки, чем исходный вариант белка С7, несущий мутацию ДДБЭ. Авторы отметили преимущества использования иПСК для редактирования генома клеток больных ДБЭ: иПСК имеют неограниченный потенциал деления и самообновления, что важно при наращивании клеточной массы из единичных отредактированных клеток; иПСК могут быть дифференцированы в различные типы клеток, в данном случае для реконструкции кожного эквивалента важно получение из отредактированных иПСК как фибробластов, так и кератиноцитов, поскольку и первые, и вторые способны продуцировать и секретировать белок С7. В данной работе показано, что с помощью специфических нуклеаз и высокоэффективной нехомологичной рекомбинации, приводящей к нокаутам гена, можно восстановить продукцию функционального белка С7 в клетках. Похожий метод редактирования генома иПСК с помощью CRISPR/Cas9 описывается в работах на другом типе ДБЭ – РДБЭ [30, 31].

Программируемые нуклеазы применяли для генной терапии других типов ВБЭ, в частности, ПБЭ, для редактирования доминантно-негативных мутаций в цитокератинах 14 и 5. В первом случае использовали улучшенный вариант Cas9 – Cas9D10A (никазу) – для генетической коррекции мутации в экзоне 6 *KRT14* [12, 24]. Во втором – на матрице *KRT5* – осуществляли редактирование TALEN-доменами для создания клеточных линий, несущих мутации ПБЭ и их последующей коррекции [19].

В последней работе была получена также делеция мутантного аллеля гена *KRT5*, причем редактирование было осуществлено на immortalized клетках пациента. В результате редактирования и удаления мутантного аллеля, имеющего доминантно-негативный характер проявления, в клетках восстановилась нормальная архитектура сети цитокератинов, исчезли внутриклеточные агрегаты, наблюдаемые у больного с ПБЭ. С помощью данной стратегии редактирования удалось направ-

ленно ввести ПСК в 5'-область кодирующей части гена. Появление ПСК вызвало деградацию мРНК редактируемого гена за счет механизма NMD. После редактирования популяция клеток представляла собой смесь клонов, прошедших редактирование нормального аллеля, мутантного аллеля, а также клонов дикого типа. Среди полученных после редактирования клеток необходимо было выбрать те, в которых произошел “нокаут” мутантного аллеля. Это осуществили с помощью биохимического и функционального анализа, отбирая клетки с нормальной структурой цитокератиновой сети.

В работе Кочера и соавт. использовалась Cas9D10A (никаза) для редактирования мутации в *KRT14* при ПБЭ [24]. Важным преимуществом никазы является ее сниженная нецелевая активность. Мутация в экзоне 6 *KRT14* встречается с высокой частотой и вызывает генерализованный тяжелый ПБЭ, никаза была направлена специфически на интрон 7, в результате последующей гомологичной рекомбинации происходило встраивание интактной копии гена и восстановление функции *KRT14*.

### РНК-терапия

Особенностью подходов, объединенных названием РНК-терапия, является то, что коррекция мутации происходит только на уровне мРНК; для восстановления функции поврежденного мутацией белка используются механизмы, лежащие в основе процессинга и сплайсинга РНК.

Первый метод основан на использовании антисенс-олигонуклеотидов для специфического выключения экзона. Пример использования – терапия РДБЭ, когда выключению подвергали экзоны гена *COL7A1*. Эффективность подхода была показана при выключении целого ряда экзонов (70, 73, 80, и 105) гена *COL7A1*; при трансплантации клеток мышам наблюдалось увеличение экспрессии *COL7A1* в зоне базальной мембраны [32]. Необходимо добавить, что выключению могут быть подвергнуты лишь экзоны, находящиеся в одной рамке считывания, что ограничивает использование данного метода. Антисенс-олигонуклеотиды успешно используются в клинике, причем часто для функциональной терапии *in vivo*, которая предполагает непосредственно вносить терапевтические агенты в организм больного для коррекции сплайсинга во всех органах и тканях.

Второй метод – SMarT-технология (Spliceosome-Mediated RNA Trans-splicing – опосредованный сплайсосомой транс-сплайсинг) – использует сплайсинг РНК, но вместо обычного цис-сплайсинга, когда соединяются экзоны, принадлежащие одной молекуле пре-мРНК, происходит транс-сплайсинг, в процессе которого соединяются экзоны, принадлежащие разным молекулам пре-мРНК. Таким образом можно соединить экзоны без мутации, заменяя участки последовательности пре-мРНК,

несущие мутации, их копиями “дикого типа”. Последние вводятся в клетку в виде экзогенных плазмид, кодирующих часть пре-мРНК, а также необходимые для сплайсинга элементы: точку ветвления, полипиримидиновый тракт и “связывающий домен”. “Связывающий домен” — это фрагмент, обеспечивающий ингибирование конкурирующего процесса цис-сплайсинга, за счет специфического связывания с эндогенной последовательностью пре-мРНК в области экзон-интронного соединения.

РНК-транс-сплайсинг как терапевтическая стратегия применяется и проходит стадию доклинических испытаний на мышах для белков PLEC, KRT14, COL17A1 и COL7A1 [33]. Первым успешным применением терапии мутаций ВБЭ с помощью транс-сплайсинга стало редактирование мутации гена *PLEC1* [34]. мРНК этого гена — 14,2 тысячи нуклеотидов — является одной из самых длинных, что сильно осложняет эффективность клонирования и трансфекции. Одним из преимуществ транс-сплайсинга является возможность использовать последовательность меньшей длины (поскольку в векторе для доставки вместо полноразмерной копии кДНК используется лишь фрагмент кДНК). Плазида для транс-сплайсинга содержала фрагмент 5'-кодирующей части и оказалась способной скорректировать все мутации, которые могли встретиться в этой области гена. Важным полезным свойством SmaRT-технологии является возможность применения одного и того же вектора для коррекции разных мутаций, локализованных в данном участке гена. Это выгодно отличает подход SmaRT от метода с программируемыми нуклеазами, где коррекция каждой мутации требует индивидуального подхода, и тем более важно, что из-за множественности мутаций, провоцирующих ВБЭ, разработка специальных терапевтических подходов персонально к каждому случаю представляется

довольно затратной. К достоинствам метода транс-сплайсинга относится сохранение эндогенного контроля генной экспрессии после коррекции мутации, что объединяет транс-сплайсинг с методами геномного редактирования. Существенным ограничением SmaRT является низкая эффективность самого процесса транс-сплайсинга, которая накладывается на возможную низкую эффективность трансфекции клеток. SmaRT удачно применяется для терапии рецессивных мутаций, когда появление в клетке даже небольших количеств функционального белка способно заметно снизить токсичность и скорректировать межклеточные взаимодействия.

Таким образом, ВБЭ — это гетерогенная группа генодерматозов, которая подразделяется на подтипы в зависимости от локализации поражения, его тяжести, вовлеченных в патогенез белков и типа мутации. За последние годы достигнут значительный прогресс в развитии методов функциональной терапии *ex vivo*, приближающей нас к применению концепции персонализированной медицины. Помимо заместительной генной терапии на основе вирусов перспективно использование программируемых синтетических нуклеаз для коррекции мутаций в аутологических клетках человека. Сочетание методов редактирования геномов и аутологических трансплантаций приводит к появлению новых биомедицинских клеточных продуктов. Некоторые методы уже применяются в клинической практике, другие — имеют большое потенциальное преимущество, но еще требуют дальнейшей лабораторной разработки до того, как будут введены в клинику.

*Работа выполнена при поддержке Программы фундаментальных исследований президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (Госзадание №0108-2018-0009).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Has C., Bruckner-Tuderman L. The genetics of skin fragility // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2014. Vol. 15. P. 245–268.
2. Fine J.D., Eady R.A., Bauer E.A. et al. The classification of inherited epidermolysis bullosa (EB): report of the third international consensus meeting on diagnosis and classification of EB // *J. Am. Acad. Dermatol.* 2008. Vol. 58. N 6. P. 931–950.
3. Uitto J., Bruckner-Tuderman L., Christiano A.M., McGrath J.A., Has C., South A.P., Kopelman B., Robinson E.C. Progress toward treatment and cure of epidermolysis bullosa: Summary of the DEBRA international research symposium EB2015 // *J. Invest. Dermatol.* 2016. Vol. 136. N 2. P. 352–358.
4. Lee J.Y.W., Liu L., Hsu C.K., Aristodemou S., Ozomena L., Ogboli M., Moss C., Martinez A.E., Mellerio J.E., McGrath J.A. Mutations in KLHL24 add to the molecular heterogeneity of epidermolysis bullosa simplex // *J. Invest. Dermatol.* 2017. Vol. 137. N 6. P. 1378–1380.

5. McGrath J.A. Recently identified forms of epidermolysis bullosa // *Ann. Dermatol.* 2015. Vol. 27. P. 658–666.
6. Cohn H.I., Teng J.M. Advancement in management of epidermolysis bullosa // *Curr. Opin. Pediatr.* 2016. Vol. 28. N 4. P. 507–516.
7. Mavilio F., Pellegrini G., Ferrari S., Di Nunzio F., Di Iorio E., Recchia A., Maruggi G., Ferrari G., Provasi E., Bonini C., Capurro S., Conti A., Magnoni C., Giannetti A., De Luca M. Correction of junctional epidermolysis bullosa by transplantation of genetically modified epidermal stem cells // *Nat. Med.* 2006. Vol. 12. N 2. P. 1397–1402.
8. Siprashvili Z., Nguyen N.T., Gorell E.S., Loutit K., Khuu P., Furukawa L.K., Lorenz H.P., Leung T.H., Keene D.R., Rieger K.E., Khavari P., Lane A.T., Tang J.Y., Marinkovich M.P. Safety and wound outcomes following genetically corrected autologous epidermal grafts in patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *JAMA.* 2016. Vol. 316. N 17. P. 1808–1817.
9. Hirsch T., Rothoefl T., Teig N., et al. Regeneration of the entire human epidermis using transgenic stem cells // *Nature.* 2017. Vol. 551. N 7680. P. 327–332.

10. Bauer J.W., Koller J., Murauer E.M., De Rosa L., Enzo E., Carulli S., Bondanza S., Recchia A., Muss W., Diem A., Mayr E., Schlager P., Gratz I.K., Pellegrini G., De Luca M. Closure of a large chronic wound through transplantation of gene-corrected epidermal stem cells // *J. Invest. Dermatol.* 2017. Vol. 137. N 3. P. 778–781.
11. Sallach J., Di Pasquale G., Larcher F., Niehoff N., Rübsam M., Huber A., Chiorini J., Almarza D., Eming S.A., Ulus H., Nishimura S., Hacker U.T., Hallek M., Niessen C.M., Büning H. Tropism-modified AAV vectors overcome barriers to successful cutaneous therapy // *Mol. Ther.* 2014. Vol. 22. N 5. P. 929–939.
12. Petek L.M., Fleckman P., Miller D.G. Efficient KRT14 targeting and functional characterization of transplanted human keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa simplex // *Mol. Ther.* 2010. Vol. 18. N 9. P. 1624–1632.
13. Chamorro C., Mencía A., Almarza D., Duarte B., Büning H., Sallach J., Hausser I., Del Río M., Larcher F., Murillas R. Gene editing for the efficient correction of a recurrent *COL7A1* mutation in recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2016. Vol. 5:e307.
14. Khan I.F., Hirata R.K., Russell D.W. AAV-mediated gene targeting methods for human cells // *Nat. Protoc.* 2011. Vol. 6. N 4. P. 482–501.
15. Melo S.P., Lisowski L., Bashkirova E., Zhen H.H., Chu K., Keene D.R., Marinkovich M.P., Kay M.A., Oro A.E. Somatic correction of junctional epidermolysis bullosa by a highly recombinogenic AAV variant // *Mol. Ther.* 2014. Vol. 22. N 4. P. 725–733.
16. Gorell E., Nguyen N., Lane A., Siprashvili Z. Gene therapy for skin diseases // *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2014. Vol. 4:a015149.
17. March O.P., Reichelt J., Koller U. Gene editing for skin diseases: designer nucleases as tools for gene therapy of skin fragility disorders // *Exp. Physiol.* 2018. Vol. 103. N 4. P. 449–455.
18. Perdoni C., Osborn M.J., Tolar J. Gene editing toward the use of autologous therapies in recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *Transl. Res.* 2016. Vol. 168. P. 50–58.
19. Aushev M., Koller U., Mussolino C., Cathomen T., Reichelt J. Traceless targeting and isolation of gene-edited immortalized keratinocytes from epidermolysis bullosa simplex patients // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017. Vol. 6. P. 112–123.
20. Jinek M., Jiang F., Taylor D.W., Sternberg S.H., Kaya E., Ma E., Anders C., Hauer M., Zhou K., Lin S., Kaplan M., Iavarone A.T., Charpentier E., Nogales E., Doudna J.A. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation // *Science.* 2014. Vol. 343. N 6176. P. 1247997.
21. Lamb B.M., Mercer A.C., Barbas C.F. 3rd Directed evolution of the TALE N-terminal domain for recognition of all 5' bases // *Nucleic Acids Res.* 2013. Vol. 41. N 21. P. 9779–9785.
22. Koo T., Lee J., Kim J.S. Measuring and reducing off-target activities of programmable nucleases including CRISPR-Cas9 // *Mol. Cells.* 2015. Vol. 38. N 6. P. 475–481.
23. Cui Y., Xu J., Cheng M., Liao X., Peng S. Review of CRISPR/Cas9 sgRNA design tools // *Interdiscip. Sci.* 2018. Vol. 10. N 2. P. 455–465.
24. Kocher T., Peking P., Klausseger A., Murauer E.M., Hofbauer J.P., Wally V., Lettner T., Hainzl S., Ablinger M., Bauer J.W., Reichelt J., Koller U. Cut and paste: efficient homology-directed repair of a dominant-negative KRT14 mutation via CRISPR/Cas9 nickases // *Mol. Ther.* 2017. Vol. 25. N 11. P. 2585–2598.
25. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity // *Science.* 2016. Vol. 351. N 6268. P. 84–88.
26. Chen J.S., Dagdas Y.S., Kleinstiver B.P., Welch M.M., Sousa A.A., Harrington L.B., Sternberg S.H., Joung J.K., Yildiz A., Doudna J.A. Enhanced proofreading governs CRISPR-Cas9 targeting accuracy // *Nature.* 2017. Vol. 550. N 7676. P. 407–410.
27. Osborn M.J., Starker C.G., McElroy A.N. et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa // *Mol. Ther.* 2013. Vol. 21. P. 1151–1159.
28. Shinkuma S., Guo Z., Christiano A.M. Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016. Vol. 113. N 20. P. 5676–5681.
29. Saito M., Masunaga T., Teraki Y., Takamori K., Ishiko A. Genotype-phenotype correlations in six Japanese patients with recessive dystrophic epidermolysis bullosa with the recurrent p.Glu2857X mutation // *J. Dermatol. Sci.* 2008. Vol. 52. N 1. P. 13–20.
30. Webber B.R., Osborn M.J., McElroy A.N., Twaroski K., Lonetree C.L., DeFeo AP, Xia L., Eide C., Lees C.J., McElmurry R.T., Riddle MJ, Kim C.J., Patel D.D., Blazar B.R., Tolar J. CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa // *NPJ Regen. Med.* 2016. Vol. 1:16014.
31. Itoh M., Kiuru M., Cairo M. S., Christiano A.M. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2011. Vol. 108. P. 8797–8802.
32. Turczynski S., Titeux M., Tonasso L., Décha A., Ishida-Yamamoto A., Hovnanian A. Targeted exon skipping restores type VII collagen expression and anchoring fibril formation in an in vivo RDEB model // *J. Invest. Dermatol.* 2016. Vol. 136. N 12. P. 2387–2395.
33. Koller U., Hainzl S., Kocher T., Hüttner C., Klausseger A., Gruber C., Mayr E., Wally V., Bauer J.W., Murauer E.M. Trans-splicing improvement by the combined application of antisense strategies // *Int. J. Mol. Sci.* 2015. Vol. 16. N 1. P. 1179–1191.
34. Wally V., Klausseger A., Koller U., Lochmüller H., Krause S., Wiche G., Mitchell L.G., Hintner H., Bauer J.W. 5' trans-splicing repair of the PLEC1 gene // *J. Invest. Dermatol.* 2008. Vol. 128. N 3. P. 568–574.

Поступила в редакцию  
25.07.2018

Принята в печать  
28.09.2018

## REVIEW

METHODS OF GENE THERAPY FOR TREATMENT  
OF INHERITED EPIDERMOLYSIS BULLOSA*A.K. Beilin, N.G. Gurskaya\*, E.A. Vorotelyak**Koltzov Institute of Developmental Biology, Russian Academy of Sciences,  
Vavilova ul. 26, 119334, Moscow, Russia;**Pirogov Russian National Research Medical University,  
Ostrovitianov ul. 1, 117997, Moscow, Russia**\* e-mail: ngurskaya@mail.ru*

Inherited epidermolysis bullosa (EB) is a heterogeneous group of rare genodermatoses with a high skin fragility manifested by the formation of destructive blisters and non-healing erosions on the skin and mucous membranes as a reaction to minor mechanical influences. There are three main types of EB: simple, junctional and dystrophic, each is caused by mutations in genes that encode epidermal, zones of the basement membrane or dermis proteins, respectively. The fourth type of EB is also described – hemidesmosomal or Kindler syndrome with impairments in kindlin-1 protein encoded by the *FERMT1* gene. The existing ways to improve the living conditions of patients with EB are at different stages of development: some of them are already used in the clinic, while others are still under laboratory research. Various strategies are used, depending on the type of EB and the nature of mutation inheritance: from the functional gene replacement therapy based on the viral expression to the genome editing methods by programmable synthetic nucleases. The accumulated experience of allogeneic and autologous transplants of skin equivalents opens the prospect for using new approaches to functional gene and cell therapy *ex vivo*.

**Keywords:** *inherited epidermolysis bullosa, human skin, epidermal stem cells, gene therapy, retrovirus, genome editing, CRISPR/Cas9, TALEN, review*

**Сведения об авторах**

*Бейлин Аркадий Константинович* — аспирант Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, мл. науч. сотр. отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова. Тел.: 8-495-434-12-83;

e-mail: arkadii.beilin@gmail.com

*Гурская Надежда Георгиевна* — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отдела регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова.

Тел: 8-495-434-12-83; e-mail: ngurskaya@mail.ru

*Воротеляк Екатерина Андреевна* — докт. биол. наук, чл.-корр. РАН, зав. отделом регенеративной медицины НИИ трансляционной медицины РНИМУ имени Н.И. Пирогова, зав. лабораторией клеточной биологии Института биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН. Тел.: 8-499-135-40-81; e-mail: vorotelyak@yandex.ru

## ОБЗОР

УДК 57.021

## РОЛЬ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В ВОСПАЛЕНИИ. МИНИ-ОБЗОР

М.А. Челомбитко

*Кафедра клеточной биологии и гистологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12  
e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Воспаление представляет собой защитную реакцию многоклеточного организма на повреждение, направленную на локализацию, уничтожение и удаление повреждающего агента, а также на восстановление (или замещение) поврежденных им тканей. В последнее время появляется все больше данных, свидетельствующих об участии активных форм кислорода (АФК) в инициации, развитии и завершении воспалительной реакции. При этом АФК выступают в качестве бактерицидных агентов и “вторичных мессенджеров” при внутриклеточной передаче сигналов. Последнюю функцию они выполняют посредством посттрансляционной модификации белков, содержащих в своем составе редокс-чувствительные остатки цистеина, которые могут подвергаться окислению. В то же время известно, что чрезмерная продукция АФК может привести к серьезному повреждению клеток и тканей и способствовать хронизации воспаления, лежащего в основе многих нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний. В настоящей работе рассматриваются сведения об участии АФК в ключевых этапах воспалительного процесса (увеличении проницаемости стенки сосудов и миграции лейкоцитов, респираторном взрыве и фагоцитозе, ангиогенезе), а также некоторых из событий, ведущих к завершению воспаления. Помимо этого, рассматривается патологическая роль АФК при окислительном стрессе.

**Ключевые слова:** активные формы кислорода, воспаление, окислительный стресс, НАДФН-оксидаза, респираторный взрыв, митохондрии

Активные формы кислорода (АФК) представляют собой свободные радикалы (молекулы или фрагменты молекул, содержащие один или более неспаренных электронов на атомных или молекулярных орбиталях), являющиеся производными молекул кислорода. К АФК относят супероксидный анион-радикал ( $O_2^{\cdot-}$ ), гидроксильный ( $HO^{\cdot}$ ) и пероксидный радикалы ( $HO_2^{\cdot}$ ), пероксид водорода ( $H_2O_2$ ), оксид азота ( $NO$ ), гипохлорную кислоту ( $HOCl$ ), а также синглетный кислород ( $^1O_2$ ) [1].

Главным источником АФК во многих типах клеток являются митохондрии. Здесь они образуются в результате работы электрон-транспортной цепи (комплексов дыхательной цепи митохондрий: I-го – НАДН-дегидрогеназы и III-го – цитохром- $b_6c_1$ -комплекса), а также дегидрогеназ в матриксе, белка  $p66shc$  в межмембранном пространстве и моноаминоксидазы во внешней мембране. АФК образуются также в результате работы других ферментов в клетке: ксантиноксидазы, циклооксигеназы, миелопероксидазы, НАДФН-оксидазы, цитохрома P450, липоксигеназы, а также оксидоредуктазы  $1\alpha$  [2].

В высоких концентрациях АФК оказывают повреждающее воздействие на ДНК, липиды и белки, а в низких – выступают в качестве важных медиаторов, участвующих в регуляции роста клеток, их адгезии, дифференцировке, клеточной гибели и др. АФК участвуют во внутриклеточном сигналинге посредством посттрансляционной мо-

дификации редокс-чувствительных белков, среди которых различные рецепторы и каналы, киназы и фосфатазы, каспазы, транскрипционные факторы. К редокс-чувствительным белкам относят те белки, которые имеют в своем составе функционально значимые остатки цистеина, которые могут подвергаться окислению. Так,  $H_2O_2$  может окислять сульфгидрильные группы цистеина ( $Cys-SH$ ) с образованием сульфеновой ( $Cys-SOH$ ) и далее сульфиновой ( $Cys-SO_2H$ ) и сульфоновой ( $Cys-SO_3H$ ) кислот. Эти модификации изменяют активность белка, влияя на его функцию в пути передачи сигнала [3].

К настоящему времени накоплено немало данных, свидетельствующих об участии АФК в инициации, развитии и завершении воспаления. Далее мы рассмотрим участие АФК в ключевых событиях этого процесса.

#### Проницаемость сосудистой стенки и миграция лейкоцитов

На первом этапе развития воспалительной реакции активированные в результате воздействия повреждающих агентов клетки врожденного иммунитета – главным образом, макрофаги и тучные – секретируют различные воспалительные медиаторы, обеспечивающие увеличение проницаемости со-

судистой стенки и миграцию лейкоцитов в очаг повреждения [4].

Многочисленные данные подтверждают важную роль АФК в регуляции данного этапа воспаления. Так, АФК регулируют экспрессию на поверхности эндотелия таких молекул межклеточной адгезии, как ICAM-1, VCAM-1, Р- и Е-селектины, что обеспечивает его взаимодействие с лейкоцитами крови и их дальнейшую трансэндотелиальную миграцию [5]. Повышенная экспрессия антиоксидантного фермента супероксиддисмутазы ухудшает прикрепление лейкоцитов к эндотелию в условиях воспаления, уменьшая экспрессию адгезивных молекул [6].

Генерируемая в области повреждения  $H_2O_2$  образует градиент и является одним из ранних факторов привлечения лейкоцитов [7]. Такие цитокины, как фактор некроза опухоли (TNF, tumor necrosis factor), ангиопоэтин-1, тромбоцитарный фактор роста (PDGF, platelet-derived growth factor), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF, vascular endothelial growth factor) и ряд компонентов внеклеточного матрикса, стимулируют миграцию и адгезию клеток, которая сопровождается активацией НАДФН-оксидазы [8]. Нейтрофилы, с пониженной активностью НАДФН-оксидазы, хуже мигрируют в очаг воспаления у мышей [9].

Также АФК действуют на проницаемость эндотелиального барьера, оказывая влияние на межклеточные контакты. Так, окклюдины — белки плотных контактов — являются редокс-чувствительными. Их экспрессия снижается в условиях окислительного стресса. Также известно, что олигомеризация окклюдина зависит от работы глутатионовой антиоксидантной системы клетки. В условиях воспаления баланс восстановленной и окисленной форм глутатиона смещается в сторону последней, что приводит к развитию окислительного стресса и нарушению сборки окклюдина, что увеличивает проницаемость плотных контактов [10].

АФК также оказывают влияние на еще один вид межклеточных соединений в эндотелии — адгезивные контакты. Это осуществляется — главным образом, за счет фосфорилирования ключевых сериновых и тирозиновых остатков белков, входящих в их состав (VE-кадгерина,  $\beta$ -катенина и катенина p120), что приводит к нарушению структуры межклеточных соединений такого типа [5]. Важную роль в диссоциации этих контактов играет малая ГТФаза Rac1 из семейства Rho. Так, было показано, что воздействие цитокина VEGF на клетки эндотелия легочных капилляров человека HMVECs вызывает в них Rac1-зависимую продукцию АФК, ведущую к фосфорилированию VE-кадгерина и  $\beta$ -катенина и разрыве контактов [11].

### Респираторный взрыв и фагоцитоз

Наиболее известной ролью АФК в воспалении является их участие в феномене “респираторного взрыва”. Прибыв в очаг воспаления, нейтрофилы

и макрофаги фагоцитируют патогены и клеточный дебрис. Этот процесс индуцирует сборку и активацию фермента НАДФН-оксидазы на мембране фагосомы. Благодаря работе данного фермента происходит восстановление  $O_2$  до  $O_2^-$ , дающего начало другим АФК. Образовавшиеся в результате “респираторного взрыва” АФК выделяются не только в фагосомы, но и в окружающую ткань. При этом они выступают, главным образом, в качестве бактерицидных агентов [12]. Интересно отметить, что, в зависимости от размера патогена, сборка НАДФН-оксидазы осуществляется либо на плазматической мембране, либо на мембране фагосом нейтрофилов. Так, микробы малого размера вызывают внутриклеточную продукцию АФК, что приводит к подавлению экспрессии интерлейкина IL-1 $\beta$  и ограничению притока новых нейтрофилов. Патогены больших размеров вызывают внеклеточную генерацию АФК, что усиливает экспрессию IL-1 $\beta$  и приводит к образованию кластеров нейтрофилов вокруг патогенов [13]. НАДФН-оксидаза играет важную роль в развитии воспалительной реакции не только благодаря ее участию в развитии “респираторного взрыва”. Данный фермент необходим также для образования внеклеточных нейтрофильных ловушек [14].

### Ангиогенез

Ангиогенез представляет собой процесс роста новых сосудов и является важным этапом пролиферативной стадии воспаления. Существуют факты, свидетельствующие о ключевой роли АФК, генерируемых НАДФН-оксидазой, на данном этапе воспалительной реакции. На клетках эндотелия пупочной вены человека HUVECs показано, что НАДФН-оксидаза расположена на лидирующем конце мигрирующей клетки и связана с актином и белком IQGAP1 (Ras GTPase-activating-like protein). Разрушение этой связи ведет к перемещению НАДФН-оксидазы из лидирующего конца и нарушению миграции эндотелиальных клеток [15]. По-видимому, влияние АФК на миграцию клеток во многом опосредуется редокс-чувствительностью малых ГТФаз семейства Rho, отвечающих за перестройку цитоскелета. Так, на клетках HUVECs было показано, что VEGF индуцирует миграцию клеток эндотелия, которая сопровождается увеличением продукции АФК в митохондриях. Использование митохондриально-направленного антиоксиданта на основе витамина Е — Mito-Vit-E, а также сверхэкспрессия митохондриальной каталазы ингибировали VEGF-индуцированную продукцию митохондриальных АФК, активацию ГТФазы Rac1 и миграцию клеток. В случае, когда в условиях эксперимента ГТФаза Rac1 находилась в конститутивно активной форме, использование антиоксиданта Mito-Vit-E не влияло на миграцию клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что АФК, генерируемые в митохондриях, регулируют миграцию этих клеток при участии Rac1 [16].

### Завершение процесса воспаления

Растет число свидетельств участия АФК в ряде процессов, способствующих естественному завершению процесса воспаления. Одним из ключевых событий, предшествующих окончанию воспаления, является массовая гибель нейтрофилов. Сигнальные пути, регулирующие апоптоз гранулоцитов и других клеток, являются АФК-зависимыми. Так, в модели антиген-индуцированного артрита у мышей показано участие  $H_2O_2$  в индукции апоптоза нейтрофилов и завершении воспалительной реакции [17].

Другим важным событием, способствующим переходу к завершающей фазе воспаления, является фагоцитоз апоптотических клеток М2-макрофагами, проявляющими противовоспалительную активность. Имеются сведения о том, что взаимодействие макрофагов с апоптотическими тельцами приводит к дестабилизации мРНК НАДФН-оксидазы за счет РНК-связывающего белка SYNCRIP (Synaptotagmin binding, cytoplasmic RNA interacting protein), что в итоге ведет к уменьшению продукции АФК и активации макрофагов по типу М2 [18]. В то же время продукция АФК играет важную роль в ходе М2-дифференцировки. Так, ингибирование НАДФН-зависимой продукции  $O_2^-$  с помощью бутилгидроксианизола специфически блокирует дифференцировку этого типа макрофагов, не оказывая влияние на развитие провоспалительных М1-макрофагов [19]. Стоит отметить, что бактерицидная активность макрофагов М1 требует продолжительной продукции АФК индуцибельной NO-синтазой, НАДФН-оксидазой, а также митохондриями. АФК играют важную роль в поддержании провоспалительного фенотипа макрофагов также за счет активации сигнального пути NF- $\kappa$ B (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells), участвующего в экспрессии провоспалительных цитокинов [20].

Известно, что АФК могут оказывать на NF- $\kappa$ B-сигналинг как активирующее, так и ингибирующее влияние. Активация транскрипционного фактора NF- $\kappa$ B под действием АФК осуществляется, главным образом, за счет инактивирующего фосфорилирования его ингибиторного белка I $\kappa$ B $\alpha$ . Так,  $H_2O_2$  влияет на фосфорилирование I $\kappa$ B $\alpha$  по остаткам тирозина, что приводит к деградации I $\kappa$ B $\alpha$  и активации NF- $\kappa$ B. При этом прямое воздействие АФК на гетеродимер NF- $\kappa$ B подавляет его способность к связыванию с ДНК. В свою очередь, NF- $\kappa$ B-сигнальный путь может влиять на внутриклеточный уровень АФК путем увеличения экспрессии различных антиоксидантных белков (супероксиддисмутаза, каталаза, тиоредоксин 1 и 2 и др.). Также NF- $\kappa$ B активирует транскрипцию ряда ферментов, участвующих в продукции АФК, таких как НАДФН-оксидаза, индуцибельная NO-синтаза, циклооксигеназа 2, липоксигеназы 5 и 12 [21].

### Окислительный стресс

Несмотря на то, что АФК являются важными регуляторными молекулами практически на всех этапах воспалительного процесса, их чрезмерное выделение митохондриями и НАДФН-оксидазой лейкоцитов и эндотелия в очаге повреждения, не скомпенсированное работой антиоксидантных систем, в конечном итоге может привести к серьезному повреждению клеток и тканей и способствовать хронизации воспаления, лежащем в основе многих нейродегенеративных, сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний [22].

При развитии в клетке окислительного стресса происходит нарушение редокс-статуса клетки: его смещение в сторону процессов окисления. При этом АФК начинают оказывать негативное влияние на различные компоненты клетки. В результате перекисного окисления липидов полиненасыщенных жирных кислот  $\omega$ -3 и  $\omega$ -6 мембранных фосфолипидов происходит повреждение мембран. Кроме того, в результате перекисного окисления липидов происходит образование относительно стабильных конечных продуктов, таких как 4-гидрокси-2-ноненаль и малоновый диальдегид, которые могут сами по себе вызывать цитотоксический эффект. Окисление белков по остаткам тирозина, серина и цистеина приводит к нарушению их функциональной активности. Развитие окислительного стресса приводит к одно- и/или двухцепочечным разрывам ДНК. Вызываемые окислительным стрессом повреждения в митохондриях сопровождаются снижением трансмембранного потенциала, изменением проницаемости мембран и ускорением высвобождения апоптотических факторов. Все вышеперечисленные факторы нарушают функциональную способность клетки, приводя к ее гибели [3, 23].

Таким образом, имеющиеся на сегодняшний день сведения о влиянии АФК на воспаление, свидетельствуют об их многогранной, но еще мало изученной роли в этом процессе. При этом известно, что АФК выступают не только в качестве бактерицидных агентов, но и участвуют в регуляции внутриклеточной передачи сигнала, а их чрезмерная продукция может способствовать хронизации воспалительного процесса. На сегодняшний день накоплено немало данных, демонстрирующих успешность применения препаратов с антиоксидантными свойствами в комплексной терапии воспалительных заболеваний [24]. При этом в последние годы растет число работ, посвященных разработке и исследованию противовоспалительных свойств митохондриально-направленных антиоксидантов. Перспективность применения подобных соединений объясняется тем, что митохондрии являются одним из основных источников АФК при развитии окислительного стресса, играющим ключевую роль в патогенезе воспалительных заболеваний [1, 25]. Изучение роли АФК различного происхождения в регуляции воспалительной реак-

ции важно не только для расширения представлений об их участии в биологических процессах, но и для понимания механизмов протекторного действия препаратов с антиоксидантными свойствами, что, в конечном счете, создает основу для разра-

ботки более эффективных противовоспалительных лекарственных средств.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-50-00029).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Feniouk B.A., Skulachev V.P. Cellular and molecular mechanisms of action of mitochondria-targeted antioxidants // *Curr. Aging Sci.* 2017. Vol. 10. N 1. P. 41–48.
2. Holmstrom K.M., Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signaling // *Nat. Rev. Mol. Cell Bio.* 2014. Vol. 15. N 6. P. 411–421.
3. Kalinina E.V., Chernov N.N., Novichkova M.D. Role of glutathione, glutathione transferase, and glutaredoxin in regulation of redox-dependent processes // *Biochemistry (Mosc.)* 2014. Vol. 79. N 13. P. 1562–1583.
4. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation // *Nature*. 2008. Vol. 454. N 7203. P. 428–435.
5. Mittal M., Siddiqui M.R., Tran K., Reddy S.P., Malik A.B. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury // *Antioxid. Redox Sign.* 2008. Vol. 20. N 7. P. 1126–1167.
6. Laurila J.P., Laatikainen L.E., Castellone M.D., Laukkanen M.O. SOD3 reduces inflammatory cell migration by regulating adhesion molecule and cytokine expression // *PLoS One*. 2009. Vol. 4. N 6:e5786.
7. Niethammer P., Grabher C., Look A.T., Mitchison T.J. A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish // *Nature*. 2009. Vol. 459. N 7249. P. 996–999.
8. Hurd T.R., DeGennaro M., Lehmann R. Redox regulation of cell migration and adhesion // *Trends Cell Biol.* 2012. Vol. 22. N 2. P. 107–115.
9. Hattori H., Subramanian K.K., Sakai J., et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. Vol. 107. N 8. P. 3546–3551.
10. Blasig I.E., Bellmann C., Cording J., Del Vecchio G., Zwanziger D., Huber O., Haseloff R.F. Occludin protein family: oxidative stress and reducing conditions // *Antioxid. Redox Sign.* 2011. Vol. 15. N 5. P. 1195–1219.
11. Monaghan-Benson E., Burrige K. The regulation of vascular endothelial growth factor-induced microvascular permeability requires Rac and reactive oxygen species // *Biol. Chem.* 2009. Vol. 284. N 38. P. 25602–25611.
12. Segal A.W. The function of the NADPH oxidase of phagocytes and its relationship to other NOXs in plants, invertebrates, and mammals // *Int. J. Biochem. Cell B.* 2008. Vol. 40. N 4–3. P. 604–618.
13. Warnatsch A., Tsourouktsoglou T.D., Branzk N., Wang Q., Reincke S., Herbst S., Gutierrez M., Papayannopoulos V. Reactive oxygen species localization programs inflammation to clear microbes of different size // *Immunity*. 2017. Vol. 46. N 3. P. 421–432.
14. Khan M.A., Palaniyar N. Transcriptional firing helps to drive NETosis // *Sci. Rep.* 2017. Vol. 7:41749.
15. Ikeda S., Yamaoka-Tojo M., Hilenski L., Patrushev N.A., Anwar G.M., Quinn M.T., Ushio-Fukai M. IQGAP1 regulates reactive oxygen species-dependent endothelial cell migration through interacting with Nox2 // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2005. Vol. 25. N 11. P. 2295–2300.
16. Wang Y., Zang Q.S., Liu Z., Wu Q., Maass D., Dulan G., Shaul P.W., Melito L., Frantz D.E., Kilgore J.A., Williams N.S., Terada L.S., Nwariaku F.E. Regulation of VEGF-induced endothelial cell migration by mitochondrial reactive oxygen species // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2011. Vol. 301. N 3. P. C695–C704.
17. Lopes F., Coelho F.M., Costa V.V., Vieira É.L., Sousa L.P., Silva T.A., Vieira L.Q., Teixeira M.M., Pinho V. Resolution of neutrophilic inflammation by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in antigen-induced arthritis // *Arthritis Rheum.* 2011. Vol. 63. N 9. P. 2651–2660.
18. Kuchler L., Giegerich A.K., Sha L.K., Knappe T., Wong M.S., Schröder K., Brandes R.P., Heide H., Wittig I., Brüne B., von Knethen A. SYNCRIP-dependent Nox2 mRNA destabilization impairs ROS formation in M2-polarized macrophages // *Antioxid. Redox Sign.* 2014. Vol. 21. N 18. P. 2483–2497.
19. Zhang Y., Choksi S., Chen K., Pobezinskaya Y., Linnola I., Liu Z.G. ROS play a critical role in the differentiation of alternatively activated macrophages and the occurrence of tumor-associated macrophages // *Cell Res.* 2013. Vol. 23. N 7. P. 898–914.
20. Tan H.Y., Wang N., Li S., Hong M., Wang X., Feng Y. The reactive oxygen species in macrophage polarization: reflecting its dual role in progression and treatment of human diseases // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2016. Vol. 2016: 2795090.
21. Morgan M.J., Liu Z.G. Crosstalk of reactive oxygen species and NF-κB signaling // *Cell Res.* 2011. Vol. 21. N 1. P. 103–115.
22. Wagener F.A., Carels C.E., Lundvig D.M. Targeting the redox balance in inflammatory skin conditions // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. Vol. 14. N 5. P. 9126–9167.
23. Dalle-Donne I., Rossi R., Colombo R., Giustarini D., Milzani A. Biomarkers of oxidative damage in human disease // *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52. N 4. P. 601–623.
24. Liu Z., Ren Z., Zhang J., Chuang C.C., Kandaswamy E., Zhou T., Zuo L. Role of ROS and nutritional antioxidants in human diseases // *Front. Physiol.* 2018. Vol. 9:477.
25. Oyewole A.O., Birch-Machin M.A. Mitochondria-targeted antioxidants // *FASEB J.* 2015. Vol. 29. N 12. P. 4766–4771.

Поступила в редакцию  
29.05.18

Принята в печать  
05.09.18

## REVIEW

## THE ROLE OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN INFLAMMATION. MINI-REVIEW

*M.A. Chelombitko*

*Department of Cell Biology and Histology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,  
Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;  
e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Inflammation is a protective response of a multicellular organism to injury. The function of inflammation is to localize and eliminate harmful stimuli, as well as repair (or replace) damaged tissues. There is increasing evidence that reactive oxygen species (ROS) participate in the initiation, progression and resolution of an inflammatory reaction. In this case, ROS act as bactericidal agents and “second messengers” in intracellular signaling. The latter function is performed by post-translational modification of proteins containing redox-sensitive cysteine residues, which are susceptible to oxidation. At the same time, overproduction of ROS can lead to cell and tissue injury and contribute to chronic inflammation underlying many neurodegenerative, cardiovascular and metabolic diseases. In this review, we focus on the role of ROS in critical inflammatory events, including increased vascular permeability and leukocyte extravasation, respiratory burst and phagocytosis, angiogenesis, as well as some events leading to the resolution of inflammation. In addition, we discuss the pathological role of ROS in oxidative stress.

**Keywords:** *reactive oxygen species, inflammation, oxidative stress, NADPH-oxidase, respiratory burst, mitochondria*

**Сведения об авторе**

*Челомбитко Мария Александровна* — мл. науч. сотр. кафедры клеточной биологии и гистологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-45-67;  
e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru

## БИОФИЗИКА

УДК 581.1

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ГРИБКОВОЙ ИНФЕКЦИИ  
*BIPOLARIS SOROKONIANA* НА СВЕТОВЫЕ РЕАКЦИИ ФОТОСИНТЕЗА  
ПШЕНИЦЫ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ФЛЮОРЕСЦЕНТНОГО МЕТОДА****Д.Н. Маторин<sup>1,\*</sup>, Н.П. Тимофеев<sup>2</sup>, А.П. Глинушкин<sup>3</sup>, Л.Б. Братковская<sup>2</sup>, Б.К. Заядан<sup>4</sup>**<sup>1</sup>Кафедра биофизики и <sup>2</sup>кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>3</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, Россия, 43050, Московская область, р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, 5-а;<sup>4</sup>Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, 050040, г. Алматы, проспект аль-Фараби, 71

\*e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Обычная корневая гниль является широко распространенным заболеванием, вызываемым грибом *Bipolaris sorokoniana*, который паразитирует на злаковых растениях. Изучено влияние грибковой инфекции на световые реакции фотосинтеза пшеницы мягкой при одновременной регистрации индукционных кривых быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния пигмента  $P_{700}$ . Обнаружено уменьшение квантового выхода электронного транспорта в фотосистеме II ( $\Phi E_0$ ) и индекса производительности ( $PI_{ABS}$ ), увеличение рассеивания энергии на реакционный центр ( $DI_0/RC$ ) и  $\Delta pH$ -зависимого нефотохимического тушения флуоресценции ( $qE$ ) у зараженных растений. Показано уменьшение пика индукции замедленной флуоресценции при 10–50 мс. Реакции фотосистемы I проявляли большую устойчивость к грибковой инфекции по сравнению с реакциями фотосистемы II. Для ранней диагностики состояния растений в условиях грибковой инфекции возможно использование параметров индукции флуоресценции хлорофилла *a*.

**Ключевые слова:** *Triticum aestivum* L., *Bipolaris sorokoniana* Shoemaker, фотосистемы I и II, фотосинтез, флуоресценция хлорофилла, фотосинтез, M-PEA-2

**Использованные сокращения:** РЦ — реакционный центр; ФСII и ФСI — фотосистемы II и I;  $Q_A$ ,  $Q_B$  — первичный и вторичный хиноновые акцепторы электрона; PQ — пластохинон; ЗФ — замедленная флуоресценция;  $P_{700}$  — пигмент РЦ ФСI.

Обыкновенная (или гельминтоспориозная) корневая гниль является широко распространенным заболеванием, вызываемым грибом *Bipolaris sorokoniana*, который паразитирует на пшенице, ржи, ячмене, овсе и некоторых других злаковых растениях [1]. Цитологические и молекулярные механизмы взаимодействия гриба с растением-хозяином являются хорошо изученными, что позволяет использовать *Bipolaris sorokoniana* в качестве модельного объекта для изучения ответной реакции растений на заражение грибковой инфекцией [2].

Фотосинтез — это один из чувствительных к стрессу процессов растительной клетки [3, 4]. Перспективным методом изучения реакций фотосинтеза растений при заражении различными патогенами является регистрация флуоресценции хлорофилла *a* [5–9]. Этот метод позволяет быстро получить неинвазивным способом обширную информацию об эффективности фотосинтеза и целостности фотосинтетического аппарата даже на

самых ранних стадиях развития патологических состояний листьев.

Существуют исследования, посвященные изучению влияния грибковых патогенов на показатели флуоресценции листьев растений [8–12]. Полученные результаты заметно отличаются друг от друга, это можно объяснить тем, что реакция растений на грибковую инфекцию сильно зависит от состояния как самого растения, так и паразитирующего гриба, а также от условий окружающей среды во время развития заболевания. Кроме того, инфекция неоднородно распределяется по органам растения, что приводит к гетерогенности показателей флуоресценции в тканях, непосредственно зараженных грибом. Те же органы, которые не были непосредственно инфицированы, могут быть косвенно модифицированы патогеном [8, 13]. Тем не менее, измерение показателей флуоресценции позволяет уже в первые дни после заражения получить информацию о характере заболевания, о степени устойчивости или восприимчивости растения к определенному штамму гриба.

Для оценки работы фотосинтетического аппарата высших растений и культур водорослей в последнее время стали широко использоваться методы анализа индукционных кривых флуоресценции

с высоким временным разрешением (от 10 мкс) [3, 4, 14, 15]. На использованном нами флуориметре “М-РЕА-2” существует возможность наряду с регистрацией флуоресценции хлорофилла измерять одновременно модулированное отражение света при длине волны 820 нм, что позволяет оценить редокс-состояние пигмента  $P_{700}$  реакционного центра (РЦ) фотосистемы I (ФСІ). Таким образом, прибор позволяет одновременно следить за отдельными реакциями фотосистем II и I (ФСII и ФСІ) и проводить регистрацию индукционных изменений замедленной флуоресценции [3, 15]. Одновременная регистрация различных параметров флуоресценции и редокс-состояния  $P_{700}$  при грибковом заражении ранее не проводилась.

В настоящей работе изучено влияние заболевания, вызываемого грибом *Bipolaris sorokoniana*, на параметры индукции быстрой и замедленной флуоресценции, а также изменения редокс-состояния реакционного центра ФСІ пшеницы мягкой. Целью исследования являлось выяснение стадий фотосинтеза, наиболее чувствительных к инфекции, и, соответственно, выявление перспективных параметров для оценки состояния зараженных растений.

### Материалы и методы

Объектом исследования служили листья пшеницы мягкой (*Triticum aestivum* L.), зараженные возбудителем корневой гнили (*Bipolaris sorokoniana* Shoemaker). Для заражения стерилизованные семена погружали в суспензию спор на 15 мин (на 100 г семян 10 г спор в 100 мл), тщательно взбалтывали, а затем сушили в марлевых мешочках в течение 24 ч при комнатной температуре. После этого зараженные и контрольные семена выращивали в чашках Петри на 25%-ном растворе Кноппа при освещении  $30 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ .

Измерение параметров флуоресценции и редокс-состояния  $P_{700}$  проводили с помощью флуориметра (Multi-function Plant Efficiency Analyser; модель “М-РЕА-2”, Hansatech Instruments, Великобритания) [3, 4, 14, 15], начиная с 6-х сут после начала прорастивания. Измерения проводили на интактных листьях с помощью специальной клипсы-прищепки, в которой световодами выведены все источники света и датчики. Перед измерением листья адаптировали к темноте в течение 15 мин. Регистрацию быстрой и замедленной флуоресценции производили при чередовании действующего красного света (625 нм,  $1300 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ ) и темновых интервалов малой длительности, достаточных для регистрации замедленной флуоресценции (ЗФ). Динамика ЗФ отражала изменения интенсивности свечения на шкале 0,1–0,9 мс в интервалах между импульсами действующего света. Индукционную кинетику флуоресценции оценивали с максимальным временным разрешением 0,02 мс.

Считается, что изменение поглощения при длине волны 820 нм отражает редокс-состояние  $P_{700}$  РЦ ФСІ. Интенсивность модулированного света ( $820 \pm 25 \text{ нм}$ ) составляла  $1000 \text{ мкЕ м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$ . Полученные данные отражения нормировались на значение при  $t = 0,7 \text{ мс}$  ( $M_{R_0}$ ) [3]. Характеристики и протокол измерений на приборе “М-РЕА-2” были подробно описаны ранее [3, 4, 14, 15].

Для количественного анализа характеристик первичных процессов фотосинтеза на основе участков индукционной кривой был использован так называемый JIP-тест [4]. Этот тест использует следующие параметры кинетической кривой индукции флуоресценции: интенсивность при длительности освещения 20 мкс ( $F_0$ ), 2 мс ( $F_J$ ), 30 мс ( $F_I$ ), 6 с ( $F_{6s}$ ), а также  $F_M$  (максимальная интенсивность флуоресценции) и  $M_0$  (усредненная величина в  $\text{мс}^{-1}$  начального наклона относительной переменной флуоресценции хлорофилла  $a$ ).

Эти величины использовали для расчета следующих параметров:

$F_V/F_M$  — максимальный квантовый выход первичной фотохимической реакции в открытых реакционных центрах ФСII;  $F_V/F_M = (F_M - F_0)/F_M$ ;

$V_J$  — относительная амплитуда фазы О-J (после 2 мс освещения). Отражает количество закрытых РЦ по отношению к общему числу РЦ, которые могут быть закрыты;  $V_J = (F_J - F_0)/(F_M - F_0)$ ;

$V_I$  — относительная амплитуда фазы О-I (после 30 мс освещения). Отражает способность ФСІ и ее акцепторов окислять пул пластохинонов;  $V_I = (F_I - F_0)/(F_M - F_0)$ ;

$\phi E_0$  — квантовый выход электронного транспорта за пределы  $Q_A$  (при  $t = 0$ );  $\phi E_0 = (1 - V_J)/(F_V/F_M)$ ;

$ABS/RC$  — поток энергии, поглощаемый одним активным РЦ. Отражает соотношение между количеством молекул хлорофилла  $a$  в антенных комплексах, излучающих флуоресценцию и количеством активных РЦ;  $ABS/RC = (M_0/V_J)/[(F_M - F_0)/F_M]$ ;

$DI_0/RC$  — общее количество энергии, рассеиваемой одним РЦ в виде тепла;  $DI_0/RC = (ABS/RC) - M_0/(1/V_J)$ ;

$PI_{ABS}$  — индекс производительности — показатель функциональной активности ФСII, отнесенный к поглощаемой энергии;  $PI_{ABS} = [1 - (F_0/F_M)]/(M_0/V_J) [(F_M - F_0)/F_0] [(1 - V_J)/V_J]$ ;

$qE$  — способность к рН-индуцированному нефотохимическому тушению флуоресценции;  $qE = (F_M - F_{6s})/(F_M - F_0)$ ;

Для анализа и обработки полученных данных использовали пакет программ Microsoft Excel 2013 (Microsoft Corporation, США) и Statistica v.6 (StatSoft, Inc., США). Проверку статистических гипотез осуществляли с помощью двухвыборочного t-критерия Стьюдента для независимых выборок, уровень значимости принимали равным 0,05. Объем выборки для контрольных и опытных образцов составлял не менее 10 повторностей.

Результаты и обсуждение

У зараженных растений до 12 сут от начала прорастивания не наблюдалось видимых изменений в окраске листьев. Небольшое выпцветание пигментов начинало происходить только после 14 сут.

Измерение соотношения интенсивности флуоресценции хлорофилла при насыщающем фотосинтезе света ( $F_M$ ) и в условиях, не вызывающих изменений состояния фотосинтетического аппарата ( $F_0$ ) (низкая интенсивность света), позволяет определить максимальную эффективность процессов ФСII, которая равна  $F_V/F_M$  [3, 4]. Параметр  $F_V/F_M$  представляет собой безразмерную энергетическую характеристику фотосинтеза, аналогичную коэффициенту полезного действия. Мы показали, что максимальный квантовый выход первичной фотохимии  $F_V/F_M$  у контрольных растений находится на высоком уровне (0,8). У зараженных растений на 7-е сут от начала прорастивания наблюдалось небольшое снижение параметра  $F_V/F_M$  (рис. 1). Уменьшение  $F_V/F_M$  на 10–14-е сут в основном происходило за счет увеличения минимального уровня флуоресценции  $F_0$  (таблица). Подобное увеличение уровня флуоресценции  $F_0$  отмечалось ранее и другими исследователями [12].

Таблица

Значения некоторых параметров JIP-теста, максимального квантового выхода ( $F_V/F_M$ ), минимальной ( $F_0$ ) и максимальной флуоресценции ( $F_M$ ), а также относительной высоты пиков  $I_1$  и  $I_4$  кривой индукции замедленной флуоресценции здорового растения и растения, зараженного корневой гнилью, на 6-е и 14-е сут от начала прорастивания (% – различие от контроля в процентах). Звездочкой указаны статистически значимые различия от контроля ( $p < 0,05$ )

|                     | Контроль    | 6-е сут заражения | 14-е сут заражения |
|---------------------|-------------|-------------------|--------------------|
| $F_V/F_M$           | 0,8 (100%)  | 0,8 (100%)        | 0,74 (92%)*        |
| $F_0$               | 100%        | 97%               | 138%*              |
| $F_M$               | 100%        | 97%               | 104%               |
| $V_j$               | 0,39 (100%) | 0,41 (106%)*      | 0,44 (113%)*       |
| $V_i$               | 0,79 (100%) | 0,79 (100%)       | 0,82 (104%)        |
| ABS/RC              | 3,16 (100%) | 3,23 (102%)       | 3,94 (125%)*       |
| DI <sub>0</sub> /RC | 0,62 (100%) | 0,65 (102%)       | 1,09 (175%)*       |
| $\phi E_0$          | 0,49 (100%) | 0,48 (96%)*       | 0,42 (86%)*        |
| PI <sub>ABS</sub>   | 2,11 (100%) | 1,91 (91%)*       | 1,52 (72%)*        |
| qE                  | 0,24 (100%) | 0,25 (104%)       | 0,3 (125%)*        |
| $I_1$               | 100%        | 88%*              | 77%*               |

Для детальной оценки изменений фотосинтетического аппарата после заражения были измерены

ВЕСТН. МОСК. УН-ТА. СЕР. 16. БИОЛОГИЯ. 2018. Т. 73. № 4

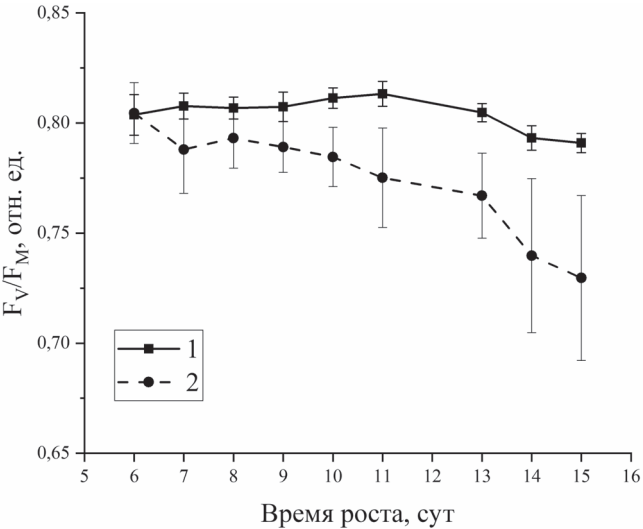
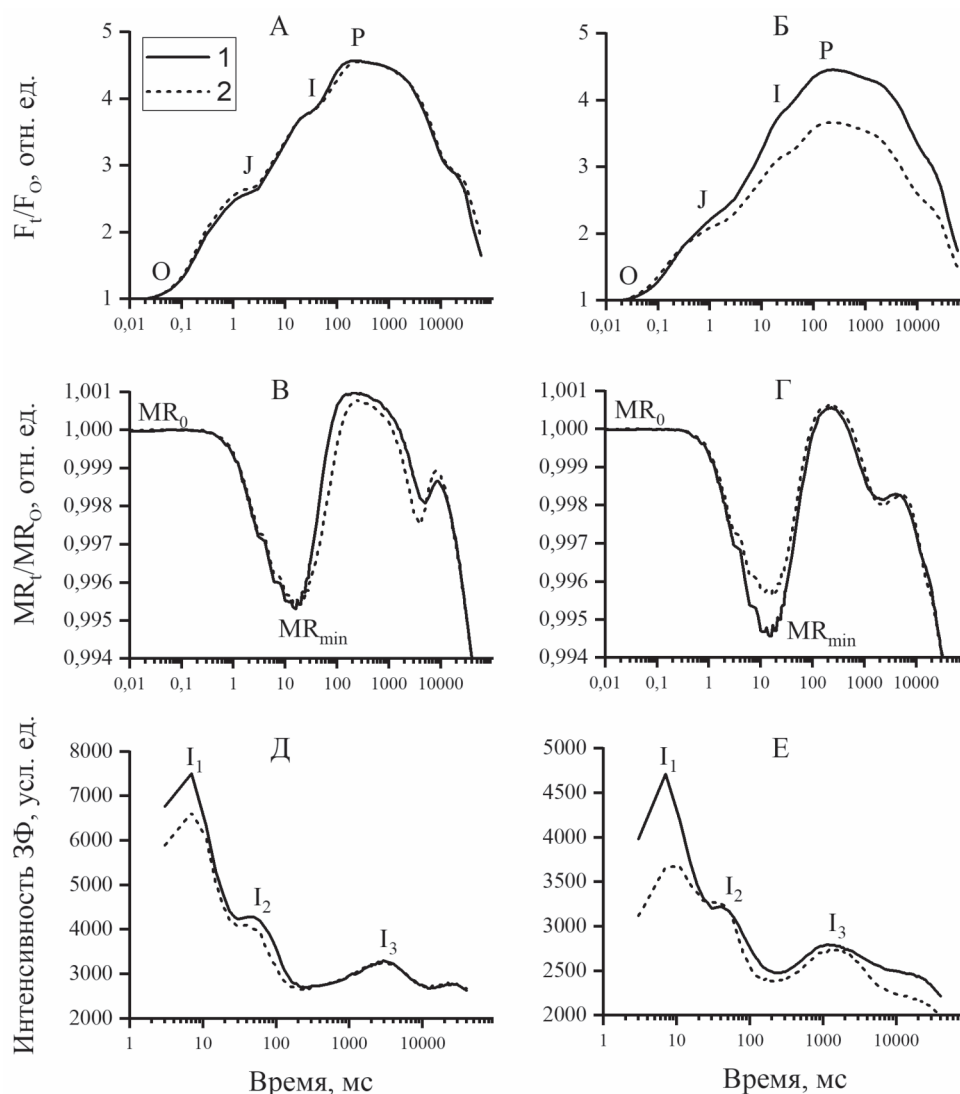


Рис. 1. Изменение максимального квантового выхода ( $F_V/F_M$ ) здоровых (1) и зараженных (2) растений с 6-е по 15-е сут прорастивания. На графике указаны средние значения по 10 повторностям. Планками обозначены границы доверительных интервалов математического ожидания при уровне значимости 0,05

ны индукционные параметры быстрой и замедленной флуоресценции, а также редокс-состояния  $P_{700}$  на приборе “М-РЕА-2”. На рис. 2 представлены кривые индукции флуоресценции листьев пшеницы на 6-е и 14-е сут от начала прорастивания. У контрольных растений кривая флуоресценции соответствовала кривой, описанной в литературе [14, 16]. В кинетике индукции быстрой флуоресценции при действии света наблюдается несколько стадий, известных как переходы О-Ж-І-Р [14]. Начальный уровень О соответствует интенсивности флуоресценции хлорофилла при “открытых” РЦ ФСII ( $F_0$ ), когда все акцепторы  $Q_A$  окислены. Фаза О-Ж обусловлена светоиндуцированным восстановлением  $Q_A$ , тогда как следующие фазы отражают, главным образом, постепенное восстановление акцепторов электронов после  $Q_A$ .

Индукционные кривые флуоресценции зараженных растений на 6-е сут мало отличались от контроля. Значимое снижение переменной флуоресценции наблюдалось в последующие дни. В таблице представлены параметры фотосинтеза, рассчитанные на основе индукционной кривой флуоресценции.

У зараженных растений, наряду с уменьшением  $F_V/F_M$ , наблюдалось увеличение О-Ж-фазы и, соответственно, возрастание параметра  $V_j$ , что указывает на увеличение доли  $Q_B$ -невосстанавливающих РЦ ФСII [14, 16]. Квантовый выход электронного транспорта ФСII ( $\phi E_0$ ) у зараженных растений также был снижен. Фаза О-І (3–30 мс) соответствует восстановлению пула пластохинонов (PQ), а параметр  $V_i$  является хорошим индикатором редокс-состояния пула PQ в темноте [16]. Выяснилось, что при заражении растений не наблюдается изменений этого параметра. Это указывает



**Рис. 2.** Кривые индукции быстрой (А, Б) и замедленной (Д, Е) флуоресценции, а также редокс-состояния  $P_{700}$  (В, Г) здоровых (1) и зараженных (2) растений. Графики слева (А, В, Д) и справа (Б, Г, Е) отражают состояние проростков на 6-е и 14-е сут соответственно. О, J, I, P – условные обозначения характерных точек кривой индукции быстрой флуоресценции, используемых для ЛР-теста.  $MR_t$ ,  $MR_0$ ,  $MR_{min}$  – текущее, начальное и минимальное значения модулированного отражения образцов при 820 нм.  $I_1$ ,  $I_2$ ,  $I_3$  – условные обозначения характерных пиков на кривой индукции замедленной флуоресценции

на отсутствие влияния заражения на электронный транспорт на уровне пула пластохинонов.

Параметр  $ABS/RC$  (отношение светособирающего комплекса на один РЦ) у зараженных растений увеличивался относительно контроля, что связано со снижением у них доли активных РЦ.

Параметр  $PI_{ABS}$  является обобщенным показателем функциональной активности ФСII, отнесенным к количеству поглощаемой энергии ( $ABS$ ) [3]. Этот параметр имел низкие показатели у зараженных растений. Это указывает на низкую функциональную активность ФСII в основном из-за снижения доли активных РЦ и активации процессов нефотохимического тушения возбужденных состояний в пигментной антенне. Уменьшение эффективности передачи энергии возбуждения со светособирающего комплекса на РЦ должно сопровождаться увеличением рассеивания неиспользуемой световой энергии. Действительно, эф-

фективность рассеивания энергии ( $DI_0/RC$ ) у зараженных растений повышается относительно контроля. Это соотносится с увеличением у них рН-зависимого нефотохимического тушения  $qE$ , которое рассчитывается по спаду флуоресценции после достижения максимума ( $qE = (F_m - F_{6s})/F_v$ ). Возможно, это вызвано действием выделяемого грибом токсина гелиментоспора, который ингибирует работу  $H^+$ -АТФазы [17].

Измерение модулированного отражения при 820 нм показало, что у адаптированного к темноте объекта имеет место фотоиндуцированное окисление  $P_{700}$  (РЦ ФСI). Максимум накопления окисленных реакционных центров  $P_{700}^+$  ( $MR_{min}$ ) наблюдался при  $t \approx 30$  мс. Это накопление потом сменяется постепенным восстановлением  $P_{700}$  (рис. 2, В и Г). При этом величины сигналов флуоресценции, отражающие восстановление  $Q_A$ , и процессы восстановления  $P_{700}$  выходят на плато при-

мерно синхронно. Параллельное накопление восстановленных форм  $P_{700}$  и  $Q_A$  отражает восстановление переносчиков на всем участке электрон-транспортной цепи между фотосистемами в связи с отсутствием оттока электронов из акцепторной части ФСІ в условиях, когда ферредоксин-НАДФ-редуктаза инактивирована инкубацией в темноте. При длительном освещении (~1–10 с) наблюдали вторую волну окисления  $P_{700}$ , которую можно объяснить оттоком электронов от ФСІ при активации ферредоксин-НАДФ-редуктазы и ферментов цикла Кальвина.

Измерения редокс-состояния  $P_{700}$  показали большую устойчивость ФСІ растений к грибковым инфекциям. У пораженных листьев, в первую очередь на 6-е сут, отмечалось только снижение скорости восстановления РЦ ФСІ от ФСІІ вследствие подавления нециклического потока электронов. На длительных сроках заболевания (14 сут) наблюдалось снижение скорости окисления  $P_{700}$ .

Миллисекундная ЗФ возникает в результате вторичной реакции рекомбинации и зависит от величины электрохимического градиента протонов на тилакоидной мембране, энергия которого снижает энергию активации реакции рекомбинации [3]. Максимум на кривой ЗФ в миллисекундном диапазоне ( $I_1$ ) совпадает с фазой возрастания J-I на индукционной кривой быстрой флуоресценции (рис. 2, Д и Е). Образование пиков  $I_1$  и  $I_2$  обусловлено накоплением определенных редокс-состояний ФСІІ, отвечающих за обратную рекомбинацию зарядов и испускание квантов ЗФ, а также усилением ЗФ за счет образующегося электрического потенциала на мембране ( $\Delta\psi$ ) [3, 14]. Третий пик ЗФ,  $I_3$  — в секундном диапазоне — связывают с фотоиндуцированным образованием трансмембранного градиента протонов ( $\Delta pH$ ), который тоже увеличивает константу скорости излучательных переходов в РЦ ФСІІ.

У листьев зараженных растений значительно снижена интенсивность ЗФ на индукционной

кривой при 10–50 мс (пик ЗФ  $I_1$ ), что, вероятно, связано со значительным уменьшением электрического потенциала на мембране тилакоидов. Важно отметить, что изменения в интенсивности ЗФ проявляются уже на ранних стадиях заражения. Это, возможно, связано с высокой чувствительностью мембранных процессов синтеза АТФ к токسينам гриба.

Изменения ЗФ листьев на ранних стадиях заболевания растения (инкубационный период) при отсутствии видимых признаков описаны для хлопчатника при заражении вертициллезным вилтом [18]. Авторам на основании измерения параметров замедленной флуоресценции (ЗФ) в этот период заболевания удалось выделить три фазы. Первые 2–7 сут наблюдаются обратимые изменения в ЗФ листьев, свидетельствующие о падении интенсивности фотосинтеза. Вероятно, этот этап является первичной ответной реакцией фотосинтетического аппарата растения на внедрение и распространение инфекционного агента в организме. Затем следует период мнимого благополучия и, наконец, одновременно с появлением внешних признаков заболевания возникают такие глубокие изменения ЗФ, которые, по-видимому, означают полное разрушение фотосинтетического аппарата [18]. Анализ индукционных кривых листьев здорового и зараженного растения хлопчатника показал, уже через 3–5 сут после заражения происходит частичное разобщение фотофосфорилирования [18]. Нами ранее также отмечалось изменение ЗФ под влиянием добавленного тентоксина, выделяемого грибом, который нарушает работу  $H^+$ -АТФазы [19].

На основе полученных данных можно рекомендовать использование параметра индукции флуоресценции  $PI_{ABS}$  и параметра индукции ЗФ при 10–50 мс для ранней диагностики состояния растений. Методы их оценки являются неинвазивными и легкими в использовании для изучения изменений в фотосинтетическом аппарате растений в условиях грибковой инфекции ростков пшеницы еще до появления видимых симптомов.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bakonyi J., Apony I., Fisch G. Diseases caused by *Bipolaris sorokiniana* and *Drechslera tritici-repentis* in Hungary // Helminthosporium blights of wheat: spot blotch and tan spot / Eds. E. Duveiller, H.J. Dubin, and J. Reeves. Mexico City: CIMMYT, 1997. P. 80–85.
2. Kumar J., Schäfer P., Hüchelhofen R., Langen G., Baltruscha H., Stein E., Kogel K.H. *Bipolaris sorokiniana*, a cereal pathogen of global concern: Cytological and molecular approaches towards better control // Mol. Plant Pathol. 2002. Vol. 3. N 4. P. 185–195.
3. Гольцев В.Н., Каладжи М.Х., Кузманова М.А., Аллахвердиев С.И. Переменная и замедленная флуоресценция хлорофилла *a* — теоретические основы и практическое приложение в исследовании растений // М.—Ижевск: ИКИ-РХД, 2014. 220 с.
4. Маторин Д.Н., Рубин А.Б. Флуоресценция хлорофилла высших растений и водорослей // М.—Ижевск: ИКИ-РХД, 2012. 256 с.
5. Christova I., Stefanov D., Velinov T., Goltsev V., Georgiev K., Abracheva P., Genov Y., Christov N. The symptomless leaf infection with grapevine leafroll associated virus 3 in grown in vitro plants as a simple model system for investigation of viral effects on photosynthesis // J. Plant Physiol. 2007. Vol. 164. N 9. P. 1124–1133.
6. Granum E., Pérez-Bueno M., Calderón C.E., Ramos C., Vicente A., Cazorla F. M., Barón M. Metabolic responses of avocado plants to stress induced by *Rosellinia necatrix* analysed by fluorescence and thermal imaging // Eur. J. Plant Pathol. 2015. Vol. 142. N 3. P. 625–632.
7. Rai M.K., Shende S., Strasser R.J. JIP test for fast fluorescence transients as a rapid and sensitive technique in assessing the effectiveness of arbuscular mycorrhizal fungi in *Zea mays*: Analysis of chlorophyll *a* fluorescence // Plant Biosyst. 2008. Vol. 142. N 2. P. 191–198.
8. Scholes J.D., Rolfe S.A. Photosynthesis in localised regions of oat leaves infected with crown rust (*Puccinia coronata*) // J. Plant Physiol. 1998. Vol. 153. N 3. P. 205–212.

nata): quantitative imaging of chlorophyll fluorescence // *Planta*. 1996. Vol. 199. N 4. P. 573–582.

9. Yan K., Han G., Ren C., Zhao S., Wu X., Bian T. *Fusarium solani* infection depressed photosystem performance by inducing foliage wilting in apple seedlings // *Front. Plant Sci.* 2018. Vol. 9:479.

10. Scholes J.D., Farrar J.F. Increased rates of photosynthesis in localized regions of a barley leaf infected with brown rust // *New Phytol.* 1986. Vol. 104. N 4. P. 601–612.

11. Bassanezi R.B., Amorim L., Filho A.B., Berger R.D. Gas exchange and emission of chlorophyll fluorescence during the monocycle of rust, angular leaf spot and anthracnose on bean leaves as a function of their trophic characteristics // *J. Phytopathol.* 2002. Vol. 150. N 1. P. 37–47.

12. Kuckenberger J., Tartachnyk I., Noga G. Temporal and spatial changes of chlorophyll fluorescence as a basis for early and precise detection of leaf rust and powdery mildew infections in wheat leaves // *Precis. Agric.* 2009. Vol. 10. N 1. P. 34–44.

13. Tartachnyk I.I., Rademacher I., Khbauch W. Distinguishing nitrogen deficiency and fungal infection of winter wheat by laser-induced fluorescence // *Precis. Agric.* 2006. Vol. 7. N 4. P. 281–293.

14. Strasser R.J., Tsimilli-Michael M., Qiang S., Goltsev V. Simultaneous in vivo recording of prompt and delayed fluorescence and 820-nm reflection changes during drying and after rehydration of the resurrection plant *Haberlea rhodo-*

*pensis* // *BBA-Bioenergetics*. 2010. Vol. 1797. N 6–7. P. 1313–1326.

15. Bulychev A.A., Osipov V.A., Matorin D.N., Vredenberg W.J. Effects of far-red light on fluorescence induction in infiltrated pea leaves under diminished  $\Delta pH$  and  $\Delta \phi$  components of the proton motive force // *J. Bioenerg. Biomembr.* 2013. Vol. 45. N 1–2. P. 37–45.

16. Lazár D., Schansker G. Models of chlorophyll *a* fluorescence transients // *Photosynthesis in silico* / Eds. A. Lausk, L. Nedbal, and Govindjee. Dordrecht: Springer, 2009. P. 85–123.

17. Briquet M., Vilre D., Goblet P., Mesa M., Elo M.C. Plant cell membranes as biochemical targets of the phyto-toxin helminthosporol // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1998. Vol. 30. N 3. P. 285–295.

18. Веселовский В.А., Веселова Т.В. Люминесценция растений. Теоретические и практические аспекты // М.: Наука, 1990. 220 с.

19. Чаморовский С.К., Маторин Д.Н. Влияние антагонистов кальмодулина на замедленную флуоресценцию хлоропластов и водорослей // *Биохимия*. 1984. Т. 49. № 13. С. 2029–2034.

Поступила в редакцию  
08.07.18

Принята к печати  
15.09.18

## BIOPHYSICS

### APPLICATION OF THE FLUORESCENCE METHOD FOR INVESTIGATING THE INFLUENCE OF ROOT ROT PATHOGEN *BIPOLARIS SOROKNIANA* ON PHOTOSYNTHETIC LIGHT REACTIONS IN WHEAT PLANTS

D.N. Matorin<sup>1,\*</sup>, N.P. Timofeev<sup>2</sup>, A.P. Glinushkin<sup>3</sup>, L.B. Bratkovskaja<sup>2</sup>, B.K. Zayadan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biophysics and <sup>2</sup>Department of Hydrobiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>3</sup>All-Russian Scientific Research Institute of Phytopathology, Str. Institute 5-a, Big Vyazemy, Moscow region, 43050, Russia;

<sup>4</sup>Al-Farabi Kazakh State University, Prospect al-Farabi, 71, Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan

\*e-mail: matorin@biophys.msu.ru

Common root rot is a widespread disease caused by the fungus *Bipolaris sorokiniana* that parasitizes on cereals. The influence of the fungal infection on light reactions of wheat photosynthesis was studied by means of simultaneous recording of the induction curves of fast and delayed chlorophyll fluorescence, as well as the redox state of  $P_{700}$ . A decrease in the quantum yield of electron transport in photosystem II ( $\phi E_0$ ) and in the performance index ( $PI_{ABS}$ ), an increase in the energy dissipation per reaction center ( $DI_0/RC$ ) and  $\Delta pH$ -dependent non-photochemical fluorescence quenching ( $qE$ ) in infected plants has been revealed. A decrease in the induction peak of delayed chlorophyll fluorescence at 10–50 ms is shown. The reactions of photosystem I exhibited greater resistance to fungal infection compared with photosystem II. The parameters of chlorophyll *a* fluorescence induction are convenient for early diagnostics of the physiological condition of plants impacted by fungal infection.

**Keywords:** *Triticum aestivum* L., *Bipolaris sorokiniana* Shoemaker, photosystem I and II, chlorophyll fluorescence, photosynthesis, M-PEA-2

#### Сведения об авторах

Маторин Дмитрий Николаевич — докт. биол. наук, проф., вед. науч. сотр. кафедры биофизики биологического факультета МГУ. Тел.: 8-499-267-45-01; e-mail: matorin@biophys.msu.ru

*Тимофеев Нюргун Петрович* — аспирант кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-39-68; e-mail: iamqoqao@gmail.com

*Глинушкин Алексей Петрович* — докт. с.-х. наук, проф., директор Всероссийского научно-исследовательского института фитопатологии. Тел.: 8-498-694-11-24; e-mail: glinale@mail.ru

*Братковская Любовь Борисовна* — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-25-18; e-mail: profkom-bio@mail.ru

*Заядан Болатхан Казыханович* — докт. биол. наук, декан биологического факультета, Казахского национального университета имени Аль-Фараби. Тел.: 8-727-249-62-04; e-mail: zbolatkhan@mail.ru

## БОТАНИКА

УДК 581.48:582.65

ПРОРАСТАНИЕ СЕМЯН ВИДОВ РОДА *ARISTOLOCHIA* (ARISTOLOCHIACEAE)О.В. Наконечная<sup>1,\*</sup>, С.В. Нестерова<sup>2</sup>, Н.М. Воронкова<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный научный центр биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН,  
690022 Владивосток, пр. 100 лет Владивостоку, 159;<sup>2</sup>Ботанический сад-институт ДВО РАН,  
690024 Владивосток, ул. Маковского, 142

\*e-mail: markelova@biosoil.ru

В работе приведены результаты исследования семян 17 видов рода *Aristolochia* (*A. arborea*, *A. baetica*, *A. inflata*, *A. gigantea*, *A. gracilis*, *A. clematidis*, *A. contorta*, *A. fimbriata*, *A. labiata*, *A. littoralis*, *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*, *A. maxima*, *A. rotunda*, *A. sempervirens*, *A. tomentosa*, *A. trilobata*). Более высокими размерными показателями характеризуются семена *A. clematidis*, *A. contorta*, *A. labiata*, *A. maxima* и *A. trilobata* а также все представители секции *Siphisia*, семена которых лишены крыла. Масса семян видов, произрастающих в условиях тропического климата (секция *Gymnolobus*), на порядок ниже, чем у видов двух других секций, представители которых обитают на территориях с умеренным климатом. Большая масса семян видов секций *Siphisia* и *Diplolobus* связана с наличием объемного эндосперма, необходимого для развития зародыша и прорастания семян через длительный промежуток времени от момента диссеминации до прорастания семян. Период от посева семян до начала прорастания и продолжительность периода прорастания индивидуальны для каждого вида; семена прорастают за время от 1 мес. до 3,5 лет. Семена видов умеренной климатической зоны секций *Diplolobus* и *Siphisia* характеризуются морфофизиологическим неглубоким покоем, начинают прорастать через 1–11 мес. после посева. Отмечено, что часть семян некоторых видов секции *Diplolobus* остается в покое, их прорастание задерживается на 2–12 мес., после чего семена продолжают прорастать. Семена большей части представителей рода тропической флоры из секции *Gymnolobus* имеют морфологический тип покоя и прорастают без задержки. Растянутый период прорастания и определенный тип эндогенного органического покоя семян имеют адаптивное значение для сохранения и выживания видов в условиях как *in situ*, так и *ex situ*.

**Ключевые слова:** *Aristolochia*, семена, морфология, размеры, масса, всхожесть, покой семян, период прорастания, распространение, секция *Diplolobus*, секция *Gymnolobus*, секция *Siphisia*

Род *Aristolochia* L. (сем. Aristolochiaceae) — кирказон — один из наиболее крупных, включает около 500 видов деревянистых и травянистых растений, распространенных в тропической, субтропической и умеренной зонах земного шара [1]. Представители рода вызывают интерес как модельная система для изучения вопросов эволюции покрытосеменных растений [2]. Многие виды обладают уникальными лекарственными свойствами. *A. littoralis* используется как противоастматическое, обезболивающее, антигистаминное, слабительное, спазмолитическое, abortивное, антидиарейное, антиревматическое средство и как инсектицид [3–5]; в мексиканской народной медицине — в качестве противоопухолевого, жаропонижающего, противоядия от укусов скорпионов [5, 6]. *A. contorta* применяется при снижении кровяного давления; проблемах с печенью, для облегчения боли; как слабительное средство; для остановки кишечного кровотечения, очистки и снятия отеков легких при воспалении [7]. Настой *A. manshuriensis* пьют при ревматизме, радикулите, используют как мочегонное, болеутоляющее, а также

при укусах змей, териотоксикозах, стоматите, диуретических явлениях, гематурии [8]. Виды рода *Aristolochia* являются перспективным ресурсом для получения новых медицинских препаратов, так как содержат целый спектр биологически активных компонентов [7]. Декоративные виды кирказонов выращивают в культуре для озеленения закрытых помещений, создания ландшафтных композиций. Ряд таксонов относятся к категории редких, эндемичных или реликтовых, сохранившихся с третичного периода [9] и требуют разработки научных подходов к сохранению генофонда *in situ* и *ex situ*.

Первым этапом в решении теоретических и практических вопросов размножения ценных и редких растений является изучение морфометрических характеристик и особенностей прорастания семян. Для ряда видов рода *Aristolochia*, представленных в данной статье, в литературных источниках имеются немногочисленные результаты исследования морфологии [10] и прорастания семян [11–18]. Зрелые семена многих растений находятся в состоянии эндогенного органического покоя [19]

и прорастают через определенный промежуток времени после посева. Это свойство имеет адаптивное значение, способствуя переживанию неблагоприятных периодов для развития проростков. Морфологический покой имеют семена *A. debilis* Sieb. et Zucc. [18], *A. esperanzae* O. Kuntze [16], *A. fimbriata* Cham. [2]. Морфофизиологический тип покоя различной глубины характерен для семян *A. galeata* Mart. et Zucc. [17], *A. baetica* L. [15], *A. macrophylla* Lam., *A. manshuriensis* Kom., *A. tomentosa* Sims [13], *A. paucinervis* Pomel. [15], *A. californica* Torr. [13]. Подобные работы немногочисленны, а в отношении многих видов рода биология семян изучена недостаточно полно.

Основной целью исследования было изучение морфометрических характеристик и особенностей прорастания семян видов рода *Aristolochia*.

### Материалы и методы

Исследования проводили в Ботаническом саду-институте ДВО РАН и Федеральном научном центре биоразнообразия наземной биоты Восточной Азии ДВО РАН.

Изучали семена 17 видов рода *Aristolochia*. Для классификации видов использовали систему, предложенную Гонзалесом и Стивенсоном [1]. К подроду *Orthoaristolochia* относятся 5 представителей секции *Diplolobus* и 9 представителей секции *Gymnolobus*. Подрод *Siphisia* представлен 3 видами секции *Siphisia*. Семена двух видов (*A. contorta* Bunge, *A. manshuriensis*) были собраны в естественных популяциях на юге Приморского края России, семена 15 видов получены по обмену из ботанических садов Франции (*A. clematitis*, *A. fimbriata*, *A. inflata*, *A. littoralis*, *A. maxima*, *A. trilobata*), Германии (*A. arborea*, *A. clematitis*, *A. gracilis*, *A. fimbriata*, *A. littoralis*, *A. macrophylla*), Австрии (*A. fimbriata*, *A. gigantea*, *A. macrophylla*), Румынии (*A. littoralis*), США (*A. tomentosa*), Чехии (*A. clematitis*), Италии (*A. baetica*, *A. sempervirens*), Швейцарии (*A. trilobata*). В работе использовали оборудование ЦКП «Биотехнология и генетическая инженерия» ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН: стереомикроскоп Stemi 2000C (Carl Zeiss, Германия) с программным обеспечением AxioVision 4.8, весы электронные аналитические AW 220 (Shimadzu, Япония).

Размерно-весовые характеристики семян, а также их внешнее строение изучали и описывали по общепринятой методике: измеряли длину, ширину семян с крылом и без крыла, площадь всего семени, а также массу 100 семян.

Семена были одновременно заложены на проращивание в чашки Петри на поверхность прокаленного влажного песка в условиях естественного освещения. Всхожесть рассчитывали как отношение числа проросших семян к числу заложенных на проращивание и выражали в процентах. В эксперименте появление первого проростка от даты посева отмечали как начало прорастания, появле-

ние последнего — как конец прорастания, дополнительным критерием окончания наблюдений был факт инфицирования и загнивания семян, после чего наблюдения прекращали. Если часть семян оставалась в покое, то есть прорастание задерживалось, при этом семена имели здоровый вид без признаков инфицирования, учитывали перерывы в прорастании. Продолжительность периода прорастания определяли как период времени от даты посева семян до окончания наблюдений. Дефектность семян оценивали визуально.

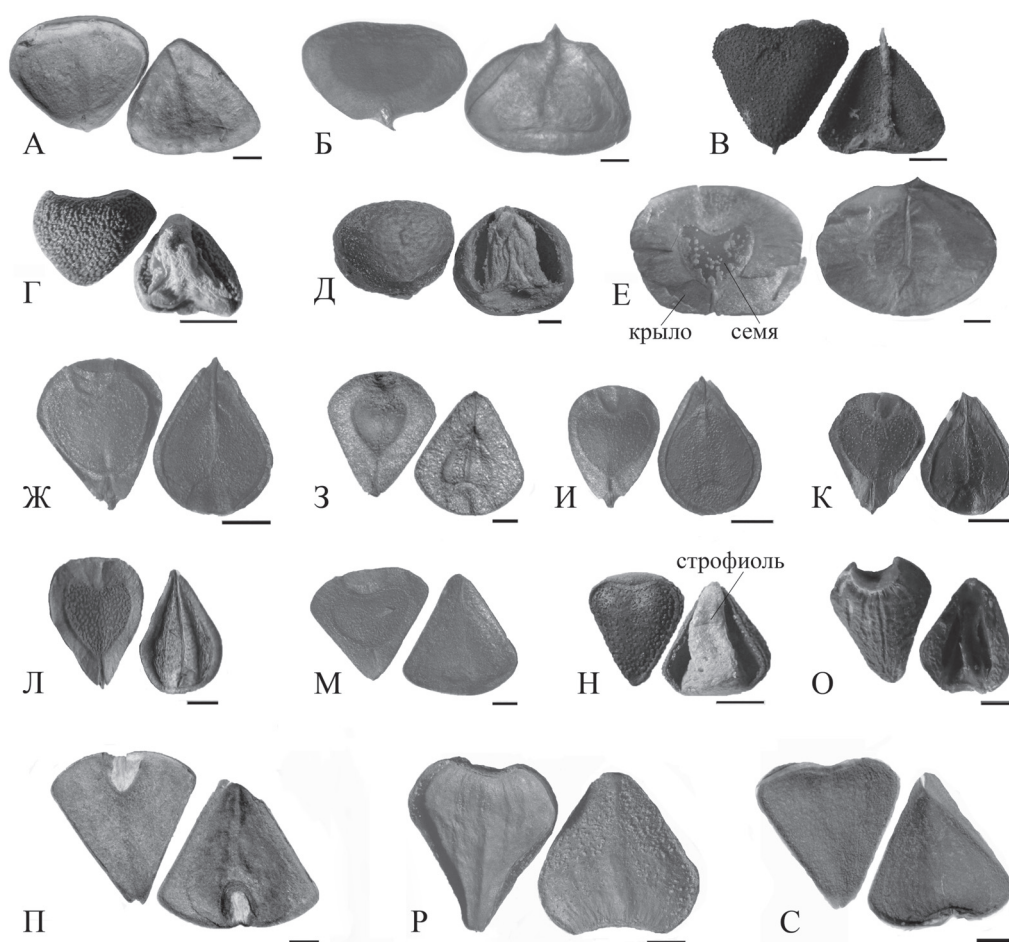
Результаты представлены как средние арифметические значения со стандартной ошибкой. Объем выборки семян ( $n$ ) для морфометрической характеристики был 40 шт. и более для всех видов, кроме *A. baetica*, где  $n = 20$ . Проращивание семян проводили в трех повторностях по 30 шт. Данные обрабатывали при помощи программы Statistica 9.0 и пакета программ с описательной статистикой MS Excel 2010.

### Результаты и обсуждение

**Морфометрические особенности семян.** Семена исследованных представителей рода *Aristolochia* по форме округло-треугольные или сердцевидные (рис. 1), с брюшной стороны гладкие, со спинной — мелкобугорчатые (*A. baetica*, *A. fimbriata*, *A. rotunda* L.) или слегка шершавые (*A. arborea* Linden, *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*, *A. sempervirens* L.), могут быть плоские (*A. littoralis* D.Parodi, *A. labiata* Willd., *A. inflata* Kunth, *A. gracilis* Duch., *A. gigantea* Mart. & Zucc., *A. maxima* Jacq.) или слегка выпуклые со спинки (*A. arborea*, *A. baetica*, *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*, *A. rotunda*, *A. sempervirens*) (рис. 1). На спинной стороне семени у ряда представителей рода расположен хорошо заметный присемянник — строфиоль. Строфиоль *A. macrophylla* и *A. manshuriensis* по форме и толщине идентична семени и легко отделяется от него. Зрелое семя *A. clematitis* полностью окружено пористым губчатым присемянником. Тонкая пленчатая строфиоль *A. contorta*, *A. gracilis*, *A. gigantea* полностью прирастает к семени, у *A. maxima* срастание частичное. У остальных видов строфиоль малозаметна.

Семена исследованных видов *Aristolochia* можно разделить на две группы: с крылом и без крыла (рис. 1, табл. 1). Семена с крылом имеют *A. contorta* из секции *Diplolobus* и почти все представители секции *Gymnolobus*. Между тем виды *A. arborea* и *A. fimbriata* (секции *Gymnolobus*) лишены крыла. Можно утверждать, что наличие крыла не является систематическим признаком для характеристики секции. Семена изученных видов из секции *Siphisia* не имеют крыла — *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*, *A. tomentosa*.

Наличие или отсутствие крыла определяет способ диссеминации. Семена, окруженные крылом, приспособлены к анемохории. Семена без крыла с губчатым пористым присемянником могут рас-



**Рис. 1.** Семена видов рода *Aristolochia*. Секция *Diplolobus*: А – *A. clematitis*, Б – *A. contorta*, В – *A. baetica*, Г – *A. rotunda*, Д – *A. sempervirens*; секция *Gymnolobus*: Е – *A. maxima*, Ж – *A. littoralis*, З – *A. labiata*, И – *A. inflata*, К – *A. gracilis*, Л – *A. gigantea*, М – *A. trilobata*, Н – *A. fimbriata*, О – *A. arborea*; секция *Siphisia*: П – *A. tomentosa*, Р – *A. macrophylla*, С – *A. manshuriensis*

пространяться водой. Ранее было показано [20], что семена *A. clematitis*, благодаря наличию пробковой ткани, способны к длительному нахождению в потоках речных вод (до 9 мес.). Для семян *A. arborea*, *A. fimbriata*, *A. rotunda*, *A. tomentosa* характерно опадение под влиянием силы тяжести (барохория). Семена *A. manshuriensis* и *A. macrophylla* имеют лентовидные придатки, что увеличивает способность к планированию в воздушных потоках (анемохория) – полет со снижением по наклонной траектории под воздействием собственной силы тяжести. Семена *A. baetica* со съедобной строфиолью разносятся муравьями [15].

Семена исследованных таксонов отличаются по своим морфометрическим характеристикам (табл. 1). Более высокими размерными показателями характеризуются семена *A. clematitis*, *A. contorta*, *A. trilobata*, *A. labiata* и *A. maxima*, а также все представители секции *Siphisia*, семена которых лишены крыла (табл. 1). По сравнению с ними остальные исследованные виды имели средние или очень мелкие семена. Следует заметить, что анализ не выявил заметных расхождений между нашими и литературными данными [10]. Незначительные отклонения в размерах семян некоторых видов

можно объяснить неоднородностью семян по размерам и массе.

При анализе массы семян было отмечено, что весовые характеристики семян видов, произрастающих в условиях тропического климата (секция *Gymnolobus*), на порядок ниже, чем у видов из двух других секций, изученные представители которых распространены на территориях с умеренным климатом (табл. 1, 2). Возможно, это является характерной особенностью для секции *Gymnolobus* по причине генетического родства видов.

По результатам нашего исследования масса семян *A. clematitis* в два раза выше по сравнению с литературными данными [11]. Однако представленные в литературе результаты не выходят за пределы полученных значений массы других исследованных нами представителей секции *Diplolobus*. Анализ морфометрических признаков семян показал, что в плодах *A. clematitis* доля дефектных семян достигает 45,8%. Масса семян *A. macrophylla*, *A. tomentosa* и *A. manshuriensis* сопоставима с данными, полученными и Адамсом с соавт. [13].

В целом морфометрические параметры семян *A. manshuriensis* и *A. macrophylla* близки по своим значениям. Некоторые авторы считают, что размеры,

Таблица 1

Размерно-весовые параметры семян исследованных видов *Aristolochia*

| Вид                       | Размеры                               |                                        | Масса 100 семян, г | Площадь, мм² |
|---------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|--------------------|--------------|
|                           | Длина, мм                             | Ширина, мм                             |                    |              |
| Секция <i>Diplolobus</i>  |                                       |                                        |                    |              |
| <i>A. baetica</i> *       | 5,97±0,37                             | 5,53±0,35                              | 2,06±0,03          | 21,33±1,76   |
| <i>A. clematitidis</i> ** | $\frac{8,06 \pm 0,06}{5,13 \pm 0,04}$ | $\frac{9,42 \pm 0,07}{7,49 \pm 0,07}$  | 3,08±0,2           | 52,00±0,66   |
| <i>A. contorta</i> **     | $\frac{6,67 \pm 0,06}{3,59 \pm 0,04}$ | $\frac{10,02 \pm 0,10}{5,60 \pm 0,02}$ | 1,13±0,02          | 67,63±1,14   |
| <i>A. rotunda</i> *       | 3,91±0,06                             | 4,54±0,11                              | 1,45±0,09          | 9,93±0,88    |
| <i>A. sempervirens</i> *  | 5,78±0,14                             | 6,07±0,17                              | —                  | 29,41±1,62   |
| Секция <i>Gymnolobus</i>  |                                       |                                        |                    |              |
| <i>A. arborea</i> *       | 6,98±0,10                             | 6,44±0,10                              | —                  | 25±1.54      |
| <i>A. fimbriata</i> *     | 4,16±0,05                             | 3,37±0,03                              | 0,44±0,03          | 9,57±0,19    |
| <i>A. gigantea</i> **     | $\frac{6,21 \pm 0,08}{4,24 \pm 0,06}$ | $\frac{5,09 \pm 0,09}{3,89 \pm 0,07}$  | 0,34±0,00          | 17,33±0,88   |
| <i>A. gracilis</i> **     | $\frac{6,28 \pm 0,08}{3,71 \pm 0,05}$ | $\frac{4,95 \pm 0,05}{3,86 \pm 0,05}$  | 0,31±0.01          | 16,33±0,88   |
| <i>A. inflata</i> **      | $\frac{5,67 \pm 0,10}{3,12 \pm 0,07}$ | $\frac{4,37 \pm 0,09}{3,52 \pm 0,21}$  | 0,20±0,00          | 17,62±0,52   |
| <i>A. labiata</i> **      | $\frac{9,35 \pm 0,12}{4,34 \pm 0,08}$ | $\frac{8,04 \pm 0,11}{4,14 \pm 0,06}$  | 0,32±0,25          | 50,18±1,42   |
| <i>A. littoralis</i> **   | $\frac{6,12 \pm 0,04}{3,34 \pm 0,02}$ | $\frac{4,58 \pm 0,03}{3,57 \pm 0,03}$  | 0,22±0,02          | 19,22±0,22   |
| <i>A. maxima</i> **       | $\frac{8,54 \pm 0,31}{4,19 \pm 0,26}$ | $\frac{10,40 \pm 0,66}{5,13 \pm 0,20}$ | —                  | 81,40±1,67   |
| <i>A. trilobata</i> **    | $\frac{8,09 \pm 0,06}{4,05 \pm 0,04}$ | $\frac{7,75 \pm 0,08}{5,03 \pm 0,06}$  | 0,67±0,03          | 40,82±5,30   |
| Секция <i>Siphisia</i>    |                                       |                                        |                    |              |
| <i>A. macrophylla</i> *   | 8,50±1,10                             | 7,38±0,12                              | 2,24±0,10          | 46,81±1,26   |
| <i>A. manshuriensis</i> * | 8,02±0,07                             | 8,37±0,04                              | 2,45±0,02          | 46,88±0,49   |
| <i>A. tomentosa</i> *     | 10,59±0,11                            | 11,60±0,13                             | 2,54±0,04          | 81,19±1,47   |

Примечание: \* — семена не имеют крыла; \*\* — семена с крылом, в числителе размеры с крылом, в знаменателе размеры без крыла, площадь семени с крылом

форма, окраска и масса семян, а также размеры зародыша и проростка *A. manshuriensis* идентичны таковым *A. macrophylla* [13]. Сходство видов можно объяснить совместной эволюционной историей. Согласно генетическим данным Гонзалиса с соавт. [8], эти виды имели общего предка и разошлись примерно 8 млн. лет назад. Между тем оба вида до настоящего времени сохранили общие черты. Это явление носит название эволюционного стазиса [14].

Площадь семян исследованных видов варьирует от 10 мм<sup>2</sup> (*A. fimbriata* и *A. rotunda*) до 80 мм<sup>2</sup> (*A. tomentosa*) (табл. 1). Наименьшими значениями характеризуются семена представителей секций

*Diplolobus* и *Gymnolobus*, лишенные крыла. Более значительные показатели площади отмечены для видов секции *Siphisia*, у которых отсутствие крыла, вероятно, компенсировано более плоской формой и увеличенными размерами семени, что имеет значение для их успешного распространения.

**Прорастание семян.** Результаты исследования всхожести семян представлены в табл. 2. Представители секции *Diplolobus* произрастают в условиях умеренного и субтропического климата и характеризуются подземным типом прорастания семян. Всхожесть варьировала от 24% до 64% в зависимости от вида. Виды секции *Gymnolobus*, обитающие

Таблица 2

Всхожесть семян видов рода *Aristolochia*

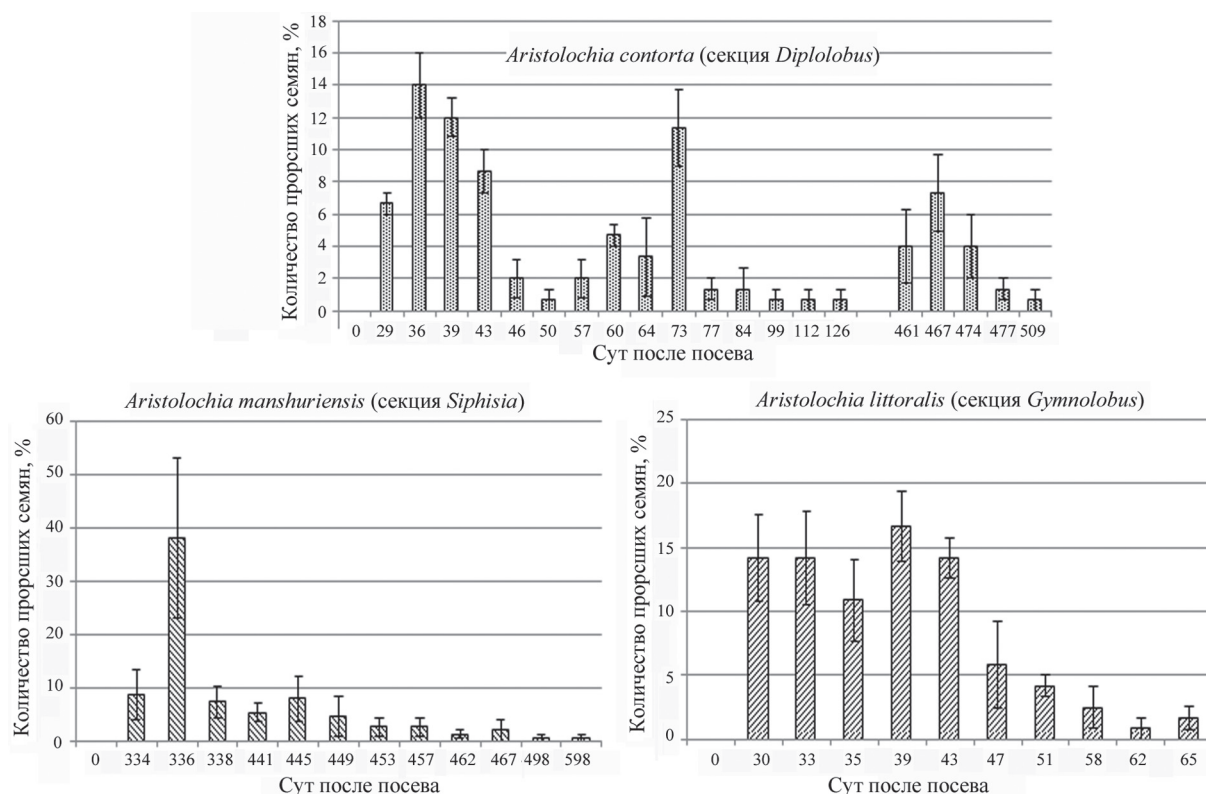
| Вид                                                        | Всхожесть, %, |                           | Распространение                       | Климат                    |
|------------------------------------------------------------|---------------|---------------------------|---------------------------------------|---------------------------|
|                                                            | Наши данные   | Литературные данные       |                                       |                           |
| Секция <i>Diplolobus</i> . Подсекция <i>Euaristolochia</i> |               |                           |                                       |                           |
| <i>A. baetica</i>                                          | 37,5*         | 30,0 [12]                 | Средиземноморье                       | Умеренный, субтропический |
| <i>A. clematitis</i>                                       | 24,0±1,1      | 17,1 [8]                  | Европейская часть                     | Умеренный                 |
| <i>A. contorta</i>                                         | 58,13±3,80    | ---                       | Азия                                  | Умеренный                 |
| <i>A. rotunda</i>                                          | 38,9*         | ---                       | Европейская часть                     | Субтропический            |
| <i>A. sempervirens</i>                                     | 64,0*         | ---                       | Средиземноморье                       | Субтропический            |
| Секция <i>Gymnolobus</i> . Подсекция <i>Hexandrae</i>      |               |                           |                                       |                           |
| <i>A. fimbriata</i>                                        | 86,7±13,3     | 59,0 [2]                  | Южная Америка                         | Тропический               |
| <i>A. gigantea</i>                                         | 42,1*         | ---                       | Центральная и Южная Америка           | Тропический               |
| <i>A. gracilis</i>                                         | 98,7±0,67     | ---                       | Южная Америка                         | Тропический               |
| <i>A. inflata</i>                                          | 100*          | ---                       | Северная, Центральная и Южная Америка | Тропический               |
| <i>A. littoralis</i>                                       | 84,5±1,2      | 56,0 [9]                  | Центральная Америка                   | Тропический               |
| <i>A. maxima</i>                                           | 11,5*         | ---                       | Центральная и Южная Америка           | Тропический               |
| <i>A. trilobata</i>                                        | 100±0         | ---                       | Центральная Америка                   | Тропический               |
| Секция <i>Siphisia</i>                                     |               |                           |                                       |                           |
| <i>A. macrophylla</i>                                      | 56,5*         | 60,0—70,0 [11], 70,0 [24] | Северная Америка                      | Умеренный                 |
| <i>A. manshuriensis</i>                                    | 84,0±4,62     | 53,0 [11]                 | Азия                                  | Умеренный                 |

Примечание: \* — проращивались все имеющиеся семена без деления на повторности

в условиях тропического влажного климата — главным образом, в Южной и Центральной Америке, имеют надземный тип прорастания семян. Всхожесть значительно варьировала, тем не менее для большей части видов секции доля проросших семян составила от 84% до 100%. Изученные виды секции *Siphisia* распространены в умеренной климатической зоне. Прорастание семян надземное, всхожесть более 50% (табл. 2). Низкая всхожесть семян (*A. maxima*) или отсутствие прорастания (*A. arborea*, *A. labiata*) можно объяснить недоразвитием зародыша, характерным для видов рода [13–15, 19, 21]; разной глубиной покоя семян; развитием в период прорастания внутренней инфекции, что приводит к гибели проростков (*A. arborea*).

Анализ наблюдений за прорастанием семян видов и образцов *Aristolochia* позволил выявить различный период времени от посева до появления первого проростка (рис. 2, табл. 3). У видов секции *Diplolobus*, представленных в эксперименте несколькими образцами, разница между календарными датами начала прорастания составила от

15–60 сут (*A. clematitis*, *A. rotunda*, *A. sempervirens*) до 122–275 сут (*A. contorta*). Представленные несколькими образцами виды секции *Gymnolobus* начинали прорасти через 15–30 сут (*A. littoralis*, *A. trilobata*) после посева, либо все образцы прорастали в один и тот же день (*A. fimbriata*). Среди видов, представленных одним образцом, самый короткий промежуток времени от посева семян до появления проростков был отмечен у *A. gracilis*, самый длинный — у *A. baetica*. Семена некоторых образцов имели перерывы в прорастании, т.е. часть семян оставалась в покое, который длился от 60 до 365 сут, после чего они вновь начинали прорасти (табл. 3). В целом продолжительность периода прорастания значительно различалась у разных видов и образцов. Более трех лет с двумя перерывами прорастали семена *A. clematitis*; часть изученных образцов *A. contorta* имели перерыв, и самая большая продолжительность периода прорастания составила 533 сут (табл. 3); без перерыва прорастали семена *A. baetica* и *A. sempervirens* — секция *Diplolobus*. Около двух лет с одним перерывом

Рис. 2. Динамика прорастания семян некоторых видов рода *Aristolochia*

прорастали семена *A. fimbriata*; в течение 30–92 сут прорастали семена других представителей секции *Gymnolobus*. Без перерыва прорастали семена видов секции *Siphisia* (рис. 2, табл. 3).

Представители рода *Aristolochia* имеют мелкий слабо дифференцированный зародыш, обильный эндосперм и многослойную семенную кожуру [13–15, 21]. Так, соотношение длины зародыша и длины семени *A. baetica* и *A. contorta* составляет 13% [15, 21], *A. bracteata* – 12,5% [22], *A. clematidis* – 6,2% [11], *A. galeata* – 8% [17], *A. paucinervis* – 9% [15], *A. californica* – 38%, *A. macrophylla* – 23% [13], *A. manshuriensis* – 21% [13], *A. tomentosa* – 27% [13]. Согласно классификации Баскин и Баскина [19], зародыш, чей размер не превышает 25% длины семени, считается недоразвитым. Морфологическая недоразвитость зародыша, а также его физиологическое состояние определяют тип эндогенного покоя семян и характер прорастания. Для завершения постэмбрионального развития зародыша и увеличения его размеров, необходимых для преодоления сопротивления семенной кожуры, требуются оптимальная температура и время, разные для каждого вида. В нашем эксперименте семена не подвергали холодной стратификации, поэтому завершение дифференциации зародыша и прорастание наблюдали при температуре +22–24°C.

Для семян *A. contorta* был проведен тест на холодную стратификацию, однако сокращение периода от посева до начала прорастания, как и повышение общей всхожести семян, не наблюдалось. Дифференциация зародыша *A. contorta* происходит

при положительной температуре [21]. Тип покоя семян охарактеризован как морфофизиологический неглубокий [23]. Наши наблюдения показали, что семена этого вида прорастают без перерыва или с периодом покоя (перерывом), т.е. у части исследуемых семян покой более глубокий (табл. 3). Покой семян *A. clematidis* и *A. rotunda* можно характеризовать как морфофизиологический неглубокий на основании того, что семена имели период до развития зародыша и перерыв в прорастании такой, как у *A. contorta*. Семена других видов секции *Diplolobus*, например, *A. baetica* имеют морфологический и морфофизиологический простой неглубокий покой [15], покой семян *A. paucinervis* – морфофизиологический комплексный промежуточный [15].

Семена представителей секции *Gymnolobus*, за исключением *A. fimbriata*, прорастали без перерыва, следовательно, для них характерен морфологический тип покоя.

Семена *A. fimbriata* прорастают с перерывом, что позволяет характеризовать покой как морфофизиологический неглубокий. Однако было обнаружено, что часть семян имеет морфологический тип покоя, о чем свидетельствует прорастание через 1 мес. после посева и без перерыва. Представители секции *Gymnolobus* произрастают в условиях тропического климата, поэтому, вероятно, для семян необходима теплая стратификация, но с меньшим по длительности периодом времени по сравнению с семенами видов секции *Diplolobus*.

По данным Адамса с соавт. [13], семена видов секции *Siphisia*, такие как *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*

Таблица 3

Прорастание семян видов рода *Aristolochia*

| Вид                                                        | Начало прорастания* | Перерыв     | Продолжение прорастания** | Продолжительность периода прорастания |
|------------------------------------------------------------|---------------------|-------------|---------------------------|---------------------------------------|
| Секция <i>Diplolobus</i> . Подсекция <i>Euaristolochia</i> |                     |             |                           |                                       |
| <i>A. baetica</i>                                          | 153                 | —           | 7                         | 159                                   |
| <i>A. clematidis</i> —1***                                 | 76                  | 213;<br>336 | 730                       | 1281                                  |
| <i>A. clematidis</i> —2***                                 | 91                  | 229;<br>183 | 761                       | 1265                                  |
| <i>A. clematidis</i> —3***                                 | 44                  | 213;<br>183 | 701                       | 1141                                  |
| <i>A. contorta</i> —1***                                   | 214                 | 61          | 20                        | 305                                   |
| <i>A. contorta</i> —2***                                   | 305                 | —           | 22                        | 327                                   |
| <i>A. contorta</i> —3***                                   | 122                 | —           | 21                        | 143                                   |
| <i>A. contorta</i> —4***                                   | 153                 | —           | 30                        | 183                                   |
| <i>A. contorta</i> —5***                                   | 30                  | 336         | 45                        | 410                                   |
| <i>A. contorta</i> —6***                                   | 153                 | 244         | 137                       | 533                                   |
| <i>A. rotunda</i> —1***                                    | 153                 | —           | 25                        | 183                                   |
| <i>A. rotunda</i> —2***                                    | 198                 | 365         | 7                         | 549                                   |
| <i>A. sempervirens</i> —1***                               | 76                  | —           | 35                        | 107                                   |
| <i>A. sempervirens</i> —2***                               | 137                 | —           | 30                        | 168                                   |
| Секция <i>Gymnolobus</i> . Подсекция <i>Hexandrae</i>      |                     |             |                           |                                       |
| <i>A. fimbriata</i> —1***                                  | 30                  | 350         | 365                       | 745                                   |
| <i>A. fimbriata</i> —2***                                  | 30                  | 275         | 304                       | 610                                   |
| <i>A. fimbriata</i> —3***                                  | 30                  | 290         | 365                       | 686                                   |
| <i>A. gigantea</i>                                         | 23                  | —           | 18                        | 41                                    |
| <i>A. gracilis</i>                                         | 4                   | —           | 28                        | 30                                    |
| <i>A. inflata</i>                                          | 22                  | —           | 18                        | 40                                    |
| <i>A. littoralis</i> —1***                                 | 18                  | —           | 17                        | 35                                    |
| <i>A. littoralis</i> —2***                                 | 15                  | —           | 25                        | 40                                    |
| <i>A. littoralis</i> —3***                                 | 30                  | —           | 31                        | 61                                    |
| <i>A. maxima</i>                                           | 40                  | —           | 15                        | 45                                    |
| <i>A. trilobata</i> —1***                                  | 61                  | —           | 153                       | 229                                   |
| <i>A. trilobata</i> —2***                                  | 45                  | —           | 45                        | 92                                    |
| <i>A. trilobata</i> —3***                                  | 30                  | —           | 60                        | 92                                    |
| Секция <i>Siphisia</i>                                     |                     |             |                           |                                       |
| <i>A. macrophylla</i>                                      | 122                 | —           | 60                        | 183                                   |
| <i>A. manshuriensis</i>                                    | 336                 | —           | 60                        | 395                                   |

Примечание: \* — время от даты посева до появления первого проростка; \*\* — период времени после перерыва до появления последнего проростка; \*\*\* — 1–6 — выборки семян, полученные из разных ботанических садов; для *A. contorta* использовали семена разных популяций; «—» — отсутствует перерыв в прорастании. Данные приведены в сут

*huriensis*, *A. tomentosa*, имеют морфологический или морфофизиологический простой неглубокий покой. Наши результаты согласуются с приведенными литературными данными (табл. 3).

Прорастание семян одного и того же вида без перерыва и с перерывом (периодом покоя), неоднозначным по времени (табл. 3), отражает их физиологическую неоднородность, вследствие чего различны тип и глубина покоя, а также продолжительность периода прорастания семян (*A. clematidis*, *A. rotunda* и др.).

Выше нами было отмечено, что масса семян видов секций *Diplolobus* и *Siphisia*, представители которых обитают в условиях умеренного климата, примерно в 10 раз превышает массу семян тропических видов секции *Gymnolobus*. Принимая во внимание, что семена представителей секций *Diplolobus* и *Siphisia* имеют морфофизиологический покой, большую массу семян этих видов можно объяснить наличием объемного эндосперма, необходимого для перенесения длительных промежутков времени от момента диссеминации до прорастания. Покой семян различной глубины и продолжительный период прорастания, вероятно, необходимы для выживания проростков в неблагоприятных условиях окружающей среды.

Таким образом, анализ полученных результатов позволил выявить ряд общих и индивидуальных морфометрических характеристик 17 видов рода *Aristolochia*. Большая часть исследованных видов имеет семена, окруженные крылом, за исключением *A. contorta* (секция *Diplolobus*), *A. arborea* и

*A. fimbriata* (секция *Gymnolobus*). Наличие крыла не является систематическим признаком секции, но носит приспособительный характер для распространения семян ветром. Отсутствие крыла у видов секции *Siphisia*, вероятно, компенсируется плоской формой и большей площадью семян. Масса семян видов секций *Diplolobus* и *Siphisia* значительно превышает массу семян видов секции *Gymnolobus*, что может быть связано с произрастанием видов в условиях умеренного климата.

Период от посева семян до начала прорастания и в целом продолжительность периода прорастания индивидуальны для каждого изученного вида, семена прорастают за время от 1 мес. до 3,5 лет. Семена видов умеренной климатической зоны секций *Diplolobus* и *Siphisia* характеризуются морфофизиологическим неглубоким покоем, начинают прорастать через 1–11 мес. после посева. Как следствие физиологической неоднородности семян и разной глубины покоя у ряда видов секции *Diplolobus* наблюдались перерывы в прорастании продолжительностью от 2 до 12 мес., в этот период семена находились в покое, после чего вновь продолжали прорастать.

Семена большей части представителей рода тропической флоры из секции *Gymnolobus* имеют морфологический тип покоя и прорастают без перерыва. Растянутый период прорастания и определенный тип эндогенного органического покоя семян имеют адаптивное значение для сохранения и выживания видов в условиях как *in situ*, так и *ex situ*.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. González F.A., Stevenson D.W. A phylogenetic analysis of the subfamily Aristolochioideae (Aristolochiaceae) // Rev. Acad. Colomb. Cienc. Exactas. 2002. Vol. 26. N 98. P. 25–60.
2. Bliss B.J., Wanke S., Barakat A. et al. Characterization of the basal angiosperm *Aristolochia fimbriata*: a potential experimental system for genetic studies // BMC Plant Biol. 2013. Vol. 13:13. DOI: 10.1186/1471-2229-13-13
3. Shi L.S., Kuo P.C., Tsai Y.L., Damu A.G., Wu T.S. The alkaloids and other constituents from the root and stem of *Aristolochia elegans* // Bioorg. Med. Chem. 2004. Vol. 12. N 2. P. 439–446.
4. Austin D.F. Ethnobotany of Florida's weedy vines // Florida's garden of good and evil. Proceedings of a Joint Conference of the Exotic Pest Plant Council and the Florida Native Plant Society. West Palm Beach: South Florida Water Management District, 1999. P. 171–179.
5. Jiménez-Ferrer J.E., Pérez-Terán Y.Y., Román-Ramos R., Tortoriello J. Antitoxin activity of plants used in Mexican traditional medicine against scorpion poisoning // Phytomedicine. 2005. Vol. 12. N 1–2. P. 116–122.
6. Argueta A., Cano L., Rodarte M. Atlas de las plantas de la medicina tradicional Mexicana. Vol. 2–3. Mexico: Editorial Instituto Nacional Indigenista, 1994. 1786 pp.
7. Zhou J., Xie G., Yan X. Encyclopedia of traditional Chinese medicines: molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications. Berlin – Heidelberg: Springer-Verlag, 2011. 730 pp.
8. Teng L., Shaw D., Barnes J. Traditional Chinese herbal medicine // Pharm. J. 2006. Vol. 276. P. 361–363.
9. González F., Wagner S.T., Salomo K., Symmank L., Marie-Stéphanie Samain M.-S., Isnard S., Rowe N.P., Neinhuis Ch., Wanke S. Present trans-Pacific disjunct distribution of *Aristolochia* subgenus *Isotrema* (Aristolochiaceae) was shaped by dispersal, vicariance and extinction // J. Biogeogr. 2014. Vol. 41. N 2. P. 380–391.
10. Pfeiffer H.W. Revision of the North and Central American hexandrous species of *Aristolochia* (Aristolochiaceae) // Ann. Missouri Bot. Gard. 1966. Vol. 53. P. 116–196.
11. Давидюк Л.К. Жизненный цикл кирказона обыкновенного в пойменных дубравах Горьковской области // Биологические основы повышения продуктивности и охраны лесных, луговых и водных фитоценозов Горьковского Поволжья. Горький: Изд-во ГГУ, 1974. С. 76–81.
12. Hall D.W., Brown B.V. Pollination of *Aristolochia littoralis* (Aristolochiales: Aristolochiaceae) by Males of *Megaselia* spp. (Diptera: Phoridae) // Ann. Entomol. Soc. Am. 1993. Vol. 86. N 5. P. 609–613.
13. Adams C.A., Baskin J.M., Baskin C.C. Comparative morphology of seeds of four closely related species of *Aristolochia* subgenus *Siphisia* (Aristolochiaceae Piperales) // Bot. J. Linn. Soc. 2005. Vol. 148. N 4. P. 433–436.
14. Adams C.A., Baskin J.M., Baskin C.C. Trait stasis versus adaptation in disjunct relict species: evolutionary changes

in seed dormancy-breaking and germination requirements in a subclade of *Aristolochia* subgenus *Siphisia* (Piperales) // Seed Sci. Res. 2005. Vol. 15. N 2. P. 161–173.

15. Berjano Pérez R. Biología de la reproducción de dos especies mediterráneas de *Aristolochia*. Sevilla: Universidad de Sevilla, 2006. 295 pp.

16. Maekawa L., Albuquerque M.C.F., Coelho M.F.B. Germination of *Aristolochia esperanzae* O. Kuntze seeds under different temperatures and light conditions // Rev. Bras. Pl. Med. 2010. Vol. 12. N 1. P. 23–30.

17. Alves-da-Silva D., Borghetti, F., Thompson K., Pritchard H., Grime J.P. Underdeveloped embryos and germination in *Aristolochia galeata* seeds // Plant Biol. 2011. Vol. 13. N S1. P. 104–108.

18. Zhou J., Teixeira da Silva J.A., Ma G. Effects of smoke water and karrikin on seed germination of 13 species growing in China // Centr Eur J Biol. 2014. Vol. 9. N 11. P. 1108–1116.

19. Baskin C.C., Baskin J.M. Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination, 1st ed. San Diego: Academic Press, 1998. 666 pp.

20. Келлер Б.А. О плодах и семенах, распространяемых весенней водой в заливных долинах рек // Русск. гидробиол. журн. 1922. Т. 1. № 1. С. 7–9.

21. Nakonechnaya O.V., Gorpenchenko T.Yu., Voronkova N.M., Kholina A.B., Zhuravlev Yu.N. Embryo structure, seed traits, and productivity of relict vine *Aristolochia contorta* (Aristolochiaceae) // Flora. 2013. Vol. 208. N 4. P. 293–297.

22. Johri B.M., Bhatnagar S.P. A contribution to the morphology and life history of *Aristolochia* // Phytomorphology. 1955. Vol. 5. N 3. P. 123–137.

23. Voronkova N.M., Kholina A.B., Koldaeva M.N., Nakonechnaya O.V., Nechaev V.A. Morphophysiological dormancy, germination, and cryopreservation in *Aristolochia contorta* seeds // Plant Ecol Evol. 2018. Vol. 151. N 1. P. 77–86.

Поступила в редакцию  
06.04.18

Принята к печати  
12.09.18

## BOTANY

### GERMINATION OF *ARISTOLOCHIA* SEEDS (ARISTOLOCHIACEAE)

O.V. Nakonechnaya<sup>1,\*</sup>, S.V. Nesterova<sup>2</sup>, N.M. Voronkova<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal Scientific Center of the East Asia Terrestrial Biodiversity, Far Eastern Branch, Russian Academy of Sciences, Pr. 100 let Vladivostoku 159, Vladivostok, 690022, Russian Federation;

<sup>2</sup>Botanical Garden-Institute, Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, Makovskii Str. 142, Vladivostok, 690024, Russian Federation

\*e-mail: markelova@biosoil.ru

The seed morphology and germination of 17 *Aristolochia* species (*A. arborea*, *A. baetica*, *A. inflata*, *A. gigantea*, *A. gracilis*, *A. clematidis*, *A. contorta*, *A. fimbriata*, *A. labiata*, *A. littoralis*, *A. macrophylla*, *A. manshuriensis*, *A. maxima*, *A. rotunda*, *A. sempervirens*, *A. tomentosa*, *A. trilobata*) were studied. The highest seed morphometric parameters were observed for *A. clematidis*, *A. contorta*, *A. trilobata*, *A. labiata* and *A. maxima*, as well as for all representatives of the section *Siphisia*, whose seeds had no wings. The seed weight characteristics of species growing in tropical climatic conditions (the *Gymnolobus* section) were an order of magnitude lower than those of the species of other two sections, growing in temperate climates. The greater weight of seeds studied for the species of *Siphisia* and *Diplolobus* sections is associated with the presence of a voluminous endosperm, which enabled the seed to be alive during a long period from dissemination to germination. The period from seed sowing to beginning of germination and length of the germination period are individual for each species, and take from 1 mo. to 3,5 yr. The seeds of the species that grow in the temperate climatic zone (sections *Diplolobus* and *Siphisia*) are characterized by a morphophysiological shallow dormancy. They began to germinate 1–11 mos after sowing. Intervals in germination from 2 to 12 mo. were observed for the species of *Diplolobus* section, after which the seeds continued to germinate. Seeds of the majority of the *Gymnolobus* section species from the tropics have a morphological type of dormancy and germinate without intervals. The prolonged germination period and non-deep simple morphophysiological dormancy of seeds have adaptive value for the species conservation and survival *in situ* and *ex situ*.

**Keywords:** *Aristolochia*, seeds, morphology, seeds size, weight, germination, seed dormancy, germination period, distribution, section *Diplolobus*, section *Gymnolobus*, section *Siphisia*

#### Сведения об авторах

Наконечная Ольга Валериевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. сектора микрочлещевого размножения ценных сельскохозяйственных и декоративных видов растений ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Тел. 8-423-231-07-02; e-mail: markelova@biosoil.ru

Нестерова Светлана Владимировна — канд. биол. наук, вед. науч. сотр. лаборатории флоры Дальнего Востока Ботанического сад-института ДВО РАН. Тел. 8-423-238-80-41; e-mail: snesterova@rambler.ru

Воронкова Нина Михайловна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории клеточной биологии и биологии развития ФНЦ Биоразнообразия ДВО РАН. Тел. 8-423-231-04-10; e-mail: voronkova@biosoil.ru

## ГИДРОБИОЛОГИЯ

УДК 574.583

ПЕРВАЯ РЕГИСТРАЦИЯ ЦВЕТЕНИЯ *THALASSIOSIRA ANGULATA* (BACILLARIOPHYCEAE) В БЕЛОМ МОРЕ: ПРОСТРАНСТВЕННОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ И СОПУТСТВУЮЩИЕ ВИДЫИ.Г. Радченко<sup>1,\*</sup>, В.П. Шевченко<sup>2</sup>, М.Д. Кравчишина<sup>2</sup>, В.В. Ильинский<sup>1</sup>, А.П. Георгиев<sup>3</sup>,  
А.В. Толстик<sup>3</sup>, А.Л. Чульцова<sup>4</sup>, Л.В. Ильяш<sup>1</sup><sup>1</sup>Кафедра гидробиологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12;<sup>2</sup>Институт океанологии имени П.П. Ширшова РАН, Россия, 117997, г. Москва, Нахимовский пр-т, д. 36;<sup>3</sup>Институт водных проблем Севера — обособленное подразделение Федерального исследовательского центра “Карельский научный центр РАН”, Россия, Республика Карелия, 185030, г. Петрозаводск, пр. Александра Невского, д. 50;<sup>4</sup>Северо-Западное отделение Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН, Россия, 163061, г. Архангельск, наб. Сев. Двины, д. 112

\*e-mail: iraradchenko@yandex.ru

Видовой состав и биомасса фитопланктона ( $V_{\text{сум}}$ ), концентрация хлорофилла “а” и биогенных элементов, а также гидрофизические условия были оценены с 5 по 12 июля 2011 г. на 29 станциях в Белом море. За исключением показателей для двух станций в поверхностном слое водной толщи, величины хлорофилла “а” и  $V_{\text{сум}}$  соответствовали уровню цветения фитопланктона ( $>1 \text{ мг/м}^3$  и  $>30 \text{ мг С/м}^3$  соответственно). Впервые на обширной акватории Белого моря отмечено доминирование по биомассе диатомовой водоросли *Thalassiosira angulata*, численность и биомасса которой в поверхностном слое достигали 24 тыс. кл/л и  $34,56 \text{ мг С/м}^3$  соответственно. На одной из прибрежных станций на глубине 3 м отмечены еще более высокие значения (179 тыс. кл/л и  $258 \text{ мг С/м}^3$ ). Основными факторами, обуславливающими пространственную изменчивость биомассы *T. angulata* являлись устойчивость водного столба (положительная связь) и соленость (отрицательная связь).

**Ключевые слова:** Белое море, цветение фитопланктона, структура фитопланктона, *Thalassiosira angulata*, биогенные элементы, гидрофизические условия

Белое море — субарктический полузамкнутый водоем, связанный с Баренцевым морем и по абиотическим условиям сочетающий черты как арктических, так и умеренных морей [1]. Особенностью термохалинной структуры вод моря является наличие квазиоднородного — в результате интенсивного приливного перемешивания (Горло, Онежский залив) — и стратифицированного (Бассейн, Двинский и Кандалакшский заливы) типов вертикального распределения температуры и солености. Динамика вод имеет сложный характер и изменяется по сезону [2].

Фитопланктон Белого моря достигает летнего пика развития (летнего цветения) в конце июня — начале июля [3, 4]. Период формирования летнего пика и состав доминирующих в это время водорослей варьируют по акватории моря, отмечается также межгодовая изменчивость [5]. Как правило, во время летнего цветения по биомассе доминируют диатомовые водоросли, однако отмечены и локальные цветения динофлагеллят [4, 6]. В список доминирующих диатомей входят представители рода *Thalassiosira*, такие как *T. nordenskioldii*, *T. angustilineata* и *T. hyalina*. Случаи цветения *T. angulata* в Белом море ранее не отмечались.

Сочетание абиотических и биотических факторов, определяющих доминирование определенного вида водорослей, даже для хорошо изученных морских экосистем, охарактеризовано не полно, а в случае цветения вида, ранее не достигавшего наибольшей биомассы в сообществе, вообще неизвестно. При наблюдаемом потеплении Арктики и субарктических районов [7] прогнозируется изменение состава доминирующих видов фитопланктона [8]. В связи с этим выявление факторов, благоприятствующих преимущественному развитию нетипичных доминантов, важно для понимания возможных тенденций изменения структуры фитопланктона полярных районов.

Цель настоящей работы состояла в оценке пространственного распределения диатомовой водоросли *Thalassiosira angulata* при ее доминировании на значительной части акватории Белого моря в первой декаде июля 2011 г., а также в анализе неоднородности пространственного распределения биомассы этой водоросли в связи с гидрологическими и гидрохимическими условиями, биомассой и структурой фитопланктона.

## Материалы и методы

Материалом для работы послужили пробы воды (объем 0,93–1,5 л), отобранные в акватории Белого моря на 29 станциях (рис. 1) с 5 по 12 июля 2011 г. в ходе рейса научно-исследовательского судна “Эколог”. На станциях 3 и 7 пробы отбирали дважды с 4-дневным интервалом, соответственно номера этих станций включают временную последовательность отбора проб: 3(1), 3(2), 7(1) и 7(2). На всех станциях мультипараметрическим зондом STD90M (Sea & Sun Technology, Германия) проводили вертикальное зондирование для измерения температуры (T), солености (S) и условной плотности ( $\sigma$ ) воды. Степень стабильности водного столба оценивали по градиенту условной плотности между глубинами (z) 20 м и 1 м ( $\Delta\sigma/\Delta z$ ), на станциях с глубиной <20 м использовали значения условной плотности воды придонного слоя. Глубину верхнего перемешиваемого слоя ( $Z_{\text{mix}}$ ) определяли как глубину, на которой вертикальный градиент условной плотности превышал  $0,03 \text{ кг/м}^3$  [9]. Границей фотической зоны ( $Z_{\text{eu}}$ ) принимали глубину с 1% фотосинтетически активной радиации. Коэффициент поглощения  $K_d$  рассчитывали по глубине исчезновения белого диска.

Воду отбирали из поверхностного горизонта, а на станциях 3(1), 7(1), 13, 15, 19, 30 и 32 – с нескольких горизонтов 10-литровыми батометрами Нискина. Определение растворенных нитритного азота ( $\text{NO}_2^-$ ), кремния (Si) и неорганического фос-

фора ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) проводили по ранее разработанным методам [10]. Определение концентрации хлорофилла “a” (хл “a”) проводили флуориметрическим методом [11] с помощью флуориметра Trilogy 1.1 (Turner Designs, США). Калибровка прибора выполнена при помощи стандарта – порошка хл “a” (C6144–1MG “Sigma”, Австрия).

Для исследования фитопланктона пробы воды объемом 1 л концентрировали методом обратной фильтрации (диаметр пор 2 мкм) и фиксировали раствором Люголя. Концентрированные пробы просчитывали под микроскопом МИКМЕД-1 (ЛОМО, Россия) при увеличении  $\times 300$  и  $\times 600$  в камере Нажотта (объем 0,05 мл). Просчитывали по 3–7 камер для каждой пробы. Для расчета биомассы объема клеток определяли методом геометрического подобию [12] с последующим переводом в единицы углерода по аллометрическим зависимостям [13].

Просчитанные пробы еще раз концентрировали для анализа в сканирующем электронном микроскопе (CAM-Scan, Великобритания) в Межфакультетской лаборатории электронной микроскопии МГУ. Препараты готовили согласно описанной ранее методике [14].

Для выявления взаимосвязи между оцениваемыми параметрами использовали канонический анализ соответствий (ССА, canonical correspondence analysis) с применением программного пакета анализа данных PAST [15]. Для анализа сходства сообществ фитопланктона использовали пакет ана-

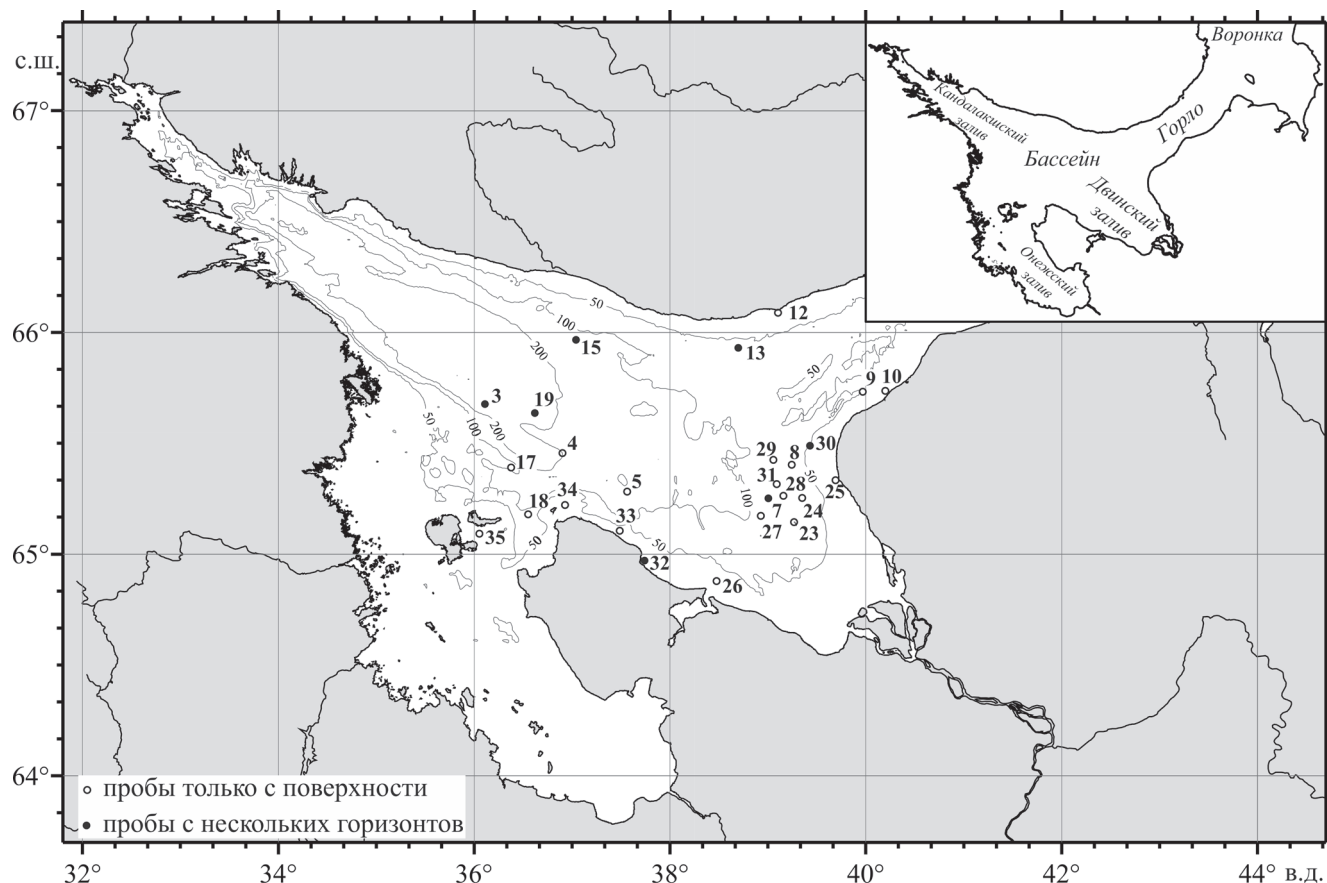


Рис. 1. Станции отбора проб фитопланктона, научно-исследовательское судно “Эколог”, Белое море, июль 2011 г.

лиза экологических данных PRIMER6 [16]. В качестве характеристики структуры фитопланктона рассматривали значения биомассы популяций водорослей ( $\text{мг С/м}^3$ ), трансформированные путем извлечения из них квадратного корня. Сходство оценивали с помощью индекса Брея–Кёртиса, чувствительного к изменению обилия как доминирующих, так и редких видов. На основании полученных матриц сходства проводили ординацию сообществ методом многомерного шкалирования (MDS, multidimensional scaling). Достоверность различий групп станций по структуре сообществ фитопланктона оценивали методом ANOSIM (analysis of similarities). Характерные виды, наличие и обилие которых обуславливало высокое сходство проб внутри каждой группы проб, выделяли с помощью процедуры SIMPER (similarity percentages) [16].

### Результаты

**Гидрологические условия и концентрация биогенных элементов.** На большей части исследованной акватории воды были стратифицированы. Наибольшая степень устойчивости водного столба отмечена в водах Двинского залива с более прогретым ( $16,0\text{--}17,4^\circ\text{C}$ ) и распресненным ( $22\text{--}26\text{‰}$ ) поверхностным слоем. Воды с квазиоднородным распределением термохалинных характеристик и слабо стратифицированные воды (станции 9, 10, 12, 18, 34, 35) характеризовались низкой температурой ( $3\text{--}10^\circ\text{C}$ ) и повышенной соленостью ( $26,7\text{--}27,6\text{‰}$ ) поверхностного слоя.  $Z_{\text{eu}}$  была глубже перемешиваемого слоя.

В поверхностном слое концентрации  $\text{NO}_2^-$  ( $0,01\text{--}0,16\text{ мкг-ат/л}$ ),  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $0,00\text{--}0,32\text{ мкг-ат/л}$ ) и Si ( $0,05\text{--}22,32\text{ мкг-ат/л}$ ) не превышали пределы колебаний содержания биогенных элементов в поверхностном слое Белого моря в летний период [17].

### Биомасса фитопланктона и доминирующие виды.

В поверхностном слое всей акватории (кроме станций 9 и 26) концентрация хл “а” превышала  $1\text{ мг/м}^3$ , что соответствует уровню цветения фитопланктона [18]. Биомасса фитопланктона ( $B_{\text{сум}}$ ) превышала  $30\text{ мг С/м}^3$  на всех станциях, кроме станций 9 и 26. Наибольшее значение  $B_{\text{сум}}$  ( $172\text{ мг С/м}^3$ ) отмечено на станции 17. Канонический анализ соответствий показал, что факторами, обуславливающими изменчивость  $B_{\text{сум}}$ , являлись стабильность водного столба и концентрация Si. На большей части акватории по биомассе преобладали диатомовые водоросли: *Thalassiosira angulata* (12 станций), *T. anguste-lineata* (4 станции), *Coscinodiscus concinnus* (3 станции), *Odontella aurita* (2 станции), *Chaetoceros radicans* (2 станции). На пяти станциях доминировали динофлагелляты: *Heterocapsa triquetra* (3 станции), *Scrippsiella acuminata* (1 станция) и *Dinophysis acuminata* (1 станция). На одной станции – эвгленовая водоросль *Eutreptia* sp. Доминирование водоросли *T. angulata* на обширной акватории Белого моря отмечено впервые.

**Морфологические признаки *Thalassiosira angulata* (W. Gregory) Hasle 1978.** Диаметр клеток  $17\text{--}37\text{ мкм}$ , створки плоские, загиб створки слабо закруглен. Ареолы на створке в прямых или искривленных тангенциальных рядах (рис. 2). Количество ареол

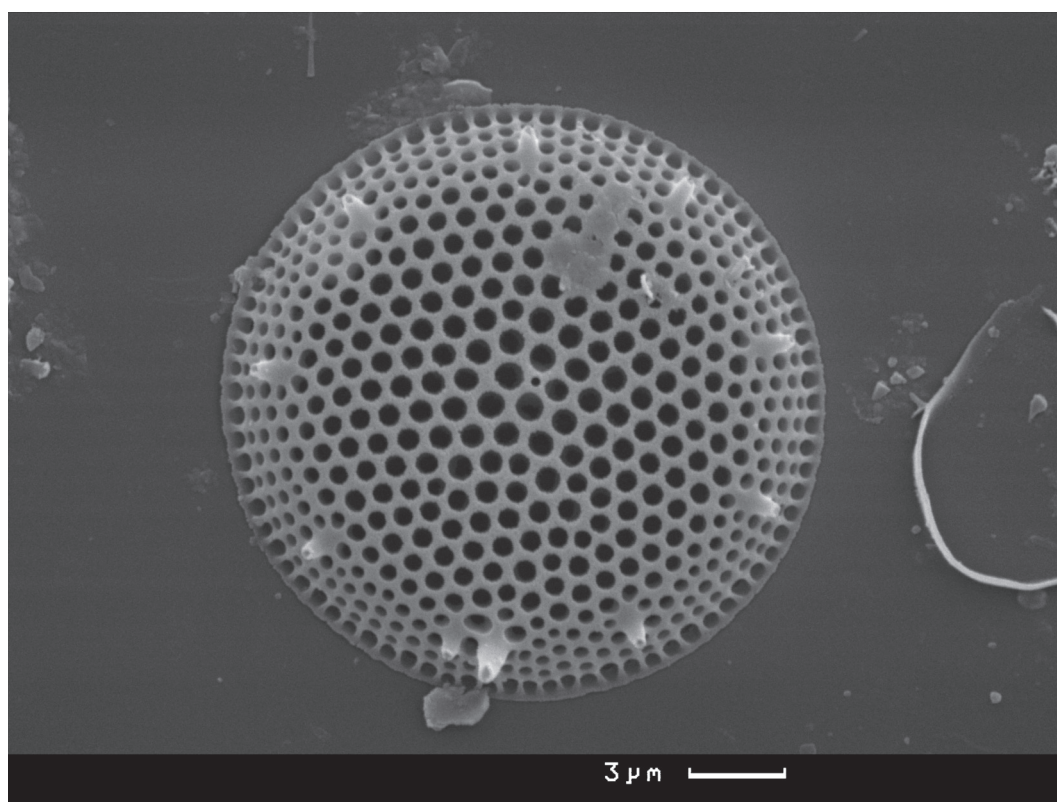


Рис. 2. Фотография наружной поверхности створки *Thalassiosira angulata* в сканирующем электронном микроскопе (CAM-Scan, Великобритания)

на створке — 11 в 10 мкм, на загибе створки — 17 в 10 мкм. Центральная ареола отсутствует или неявно выражена. Имеются один центральный вырост с опорами и одно кольцо краевых выростов с опорами. Кольцо краевых выростов отделяет от края вальвы 2–3 ряда ареол. Краевые выросты — с длинными внешними трубками, широко расставлены. Двугубый вырост — крупный, с длинной внешней трубкой, расположен в кольце краевых выростов с опорами вблизи одного из них. Все перечисленные признаки соответствуют описанию *T. angulata* (W.Gregory) Hasle [19].

Зависимость пространственного распределения *T. angulata* от факторов окружающей среды. Диатомея *T. angulata* вегетировала в поверхностном слое на всей исследованной акватории за исключением станции 35. Ее численность изменялась от 0,06 до 24 тыс. кл/л, биомасса варьировала в пределах 0,08–34,56 мг С/м<sup>3</sup>. При повторных съемках зафиксированы возрастание (станция 3) или убывание (станция 7) биомассы *T. angulata*. На станциях, где *T. angulata* преобладала по биомассе, ее вклад в  $V_{\text{сум}}$  варьировал от 11% до 47%. Наименьшие значения биомассы *T. angulata* (< 2 мкг С/м<sup>3</sup>) отмечены в слабо стратифицированных и перемешанных водах (станции 9, 10, 12, 18 и 34) с низкой температурой и повышенной соленостью поверхностного слоя. Канонический анализ соответствий также показал, что варьирование биомассы *T. angulata* определялось устойчивостью водного столба (положительная связь) и соленостью (отрицательная связь).

В вертикальном распределении *T. angulata* наибольшая биомасса отмечалась либо в поверхностном слое (станции 13 и 15), либо на глубинах 3 м (станция 32) — 5 м (станции 7, 19, 30). Наибольшие значения численности и биомассы (179 тыс. кл/л и 258 мг С/м<sup>3</sup>) зарегистрированы на горизонте 3 м прибрежной станции 32.

Именно *T. angulata* выступала характерным видом, обуславливающим высокое сходство фитопланктона (51%) в группе из 20 станций (группа I, рис. 3). В остальных двух группах биомасса *T. angulata* была меньше, и характерными видами были

*S. acuminata*, *C. concinnus* (группа II) и *T. anguste-lineata* и *O. aurita* (группа III).

**Связь изменчивости биомассы других доминирующих видов с факторами среды.** Канонический анализ соответствий показал, что распределение биомассы доминирующих видов объяснялось взаимодействием учтенных факторов на 76%, в первую очередь содержанием  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $Z_{\text{mix}}$ , и в меньшей степени — S, T,  $\Delta\sigma$ ,  $Z_{\text{eu}}$  и концентрацией Si. Так, изменчивость биомассы *O. aurita* определяли  $Z_{\text{mix}}$  и концентрации  $\text{NO}_2^-$  и  $\text{PO}_4^{3-}$ . Изменчивость биомассы *C. concinnus* была отрицательно связана с концентрацией Si и положительно — с  $Z_{\text{eu}}$ , а изменчивость биомассы *C. radicans* — отрицательно с S и положительно с  $\Delta\sigma$ . Изменчивость биомасс динофлагеллят *S. acuminata* и *D. acuminata* слабо коррелировала с  $Z_{\text{eu}}$ , тогда как для *H. triquetra* — положительно коррелировала с T и отрицательно — с  $Z_{\text{mix}}$ . Распределение биомасс *T. anguste-lineata* и *Eutrepia* sp. слабо зависело от Si.

### Обсуждение

В первой декаде июля 2011 г. на значительной акватории Бассейна и Двинского залива Белого моря фитопланктон находился на стадии летнего цветения, о чем свидетельствуют величины концентраций хл “a” 1,0–3,3 мг/м<sup>3</sup> в поверхностных водах. При этом на большей части акватории по биомассе преобладала диатомовая водоросль *T. angulata*, ранее в Белом море в состав доминирующих видов не входившая. Преобладание *T. angulata* отмечено при выраженной стратификации водного столба с температурой и соленостью поверхностного слоя 10–16°C и 24,4–26,8‰ соответственно. На одних участках акватории моря цветение *T. angulata* продолжалось, тогда как на других шло на убыль.

*T. angulata* — широко распространенный вид в полярных и умеренных водах [19, 20]. В Белом море эта диатомея отмечалась в планктоне с весны до зимы [21, 22] и во льду как *T. cf. angulata* [23]. Круглогодичная вегетация *T. angulata* свидетельствует о широком диапазоне толерантности этой водоросли к таким факторам как температура и соленость воды, концентрация минеральных форм биогенных элементов в верхнем перемешанном слое и условия освещенности.

Нетипичное массовое развитие *T. angulata* в Белом море может быть связано с изменением климата. Так, повышение температуры воздуха над акваторией моря и его бассейном [24] ведет к повышению температуры поверхностного слоя вод, увеличению количества осадков и объема речного стока. Это, в свою очередь, обуславливает выраженную стратификацию водного столба, повышенную температуру и пониженную соленость в поверхностном слое, что способствует формированию условий, благоприятствующих развитию *T. angulata*. Поэтому, с учетом климатической тен-

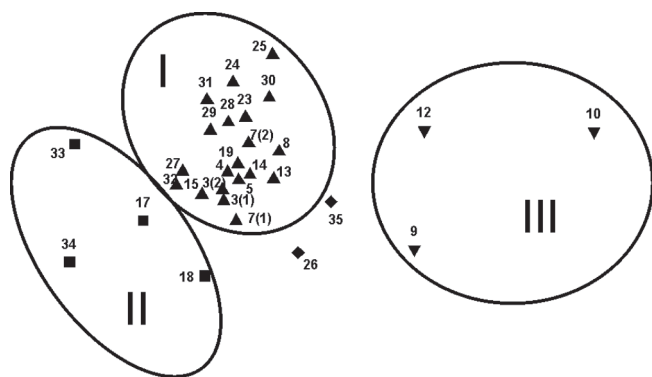


Рис. 3. Ординация станций по сходству фитопланктона (цифры — номера станций). Сплошной линией показаны группы станций, различающиеся по структуре фитопланктона (I, II и III)

денции, можно ожидать регулярного летнего цветения этой диатомеи в Белом море.

Авторы благодарят экипаж НИС “Эколог” и сотрудников ИО РАН А.А. Ключиткина, А.И. Мамочкину, А.Н. Новигатского, Н.В. Политову и А.С. Филиппова за помощь, оказанную в ходе экспедиции.

Работа по анализу проб в сканирующем электронном микроскопе выполнена на оборудовании

ЦКП Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ. Исследование структуры фитопланктона проведено в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (тема № АААА-А16-116021660052-0). Интерпретация данных по хлорофиллу и биогенным элементам выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-27-00114-П).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Berger V., Dahle S., Galaktionov K., Kosobokova X., Naumov A., Rat'kova T., Savinov V., Savinova T. White sea. Ecology and environment. St. Petersburg—Tromsø: Derzavets Publisher, 2001. 157 p.
- Pantyulin A.N. Hydrological system of the White sea // Oceanology. 2003. Vol. 43. N Suppl.1. P. S1—S14.
- Ilyash L.V., Belevich T.A., Zhitina L.S., Radchenko I.G., Ratkova T.N. Phytoplankton of the White sea // The handbook of environmental chemistry / Eds. D. Barceló and A.G. Kostianoy. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018. DOI: 10.1007/698\_2018\_320
- Ilyash L.V., Radchenko I.G., Shevchenko V.P., Zdorovenkov R.E., Pantyulin A.N. Contrasting summer phytoplankton communities in stratified and mixed waters of the White sea // Oceanology. 2014. Vol. 54. N 6. P. 730—738.
- Ilyash L.V., Zhitina L.S., Belevich T.A., Shevchenko V.P., Kravchishina M.D., Pantyulin A.N., Tolstikov A.V., Chultsova A.L. Spatial distribution of the phytoplankton in the White sea during atypical domination of dinoflagellates (July 2009) // Oceanology. 2016. Vol. 56. N 3. P. 372—381.
- Ilyash L.V., Belevich T.A., Stupnikova A.N., Drits A.V., Flint M.V. Effects of local hydrophysical conditions on the spatial variability of phytoplankton in the White sea // Oceanology. 2015. Vol. 55. N 2. P. 216—225.
- IPCC, Intergovernmental Panel on climate change. Climate change 2007: the physical science basis. Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change / Eds. S. Solomon, D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor, and H.L. Miller. N.Y.: Cambridge Univ. Press, 2007. 996 p.
- Lovejoy C., Vincent W.F., Bonilla S., Roy S., Martineau M.J., Terrado R., Potvin M., Massana R., Pedros-Alio C. Distribution, phylogeny, and growth of cold-adapted picoprassinophytes in arctic seas // J. Phycol. 2007. Vol. 43. N 1. P. 78—89.
- de Boyer Montégut C., Madec G., Fischer A.S., Lazar A., Iudicone D. Mixed layer depth over the global ocean: an examination of profile data and a profile-based climatology // J. Geophys. Res. 2004. Vol. 109. N C12. DOI: 10.1029/2004JC002378
- Grasshoff K., Ehrhardt M., Kremling K. Methods of seawater analysis. Weinheim; N.Y.; Chicester; Brisbane; Singapore; Toronto: Wiley-VCH, 1999. 600 p.
- Arar E.J., Collins G.B. Method 445.0. *In vitro* determination of chlorophyll “a” and pheophytin “a” in marine and freshwater algae by fluorescence. Revision 1.2. Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency, 1997. 22 p.
- Hillebrand H., Dürselen C.-D., Kirschtel D., Pollinger U., Zohary T. Biovolume calculation for pelagic and benthic microalgae // J. Phycol. 1999. Vol. 35. N 2. P. 403—424.
- Menden-Deuer S., Lessard E.J. Carbon to volume relationships for dinoflagellates, diatoms, and other protist plankton // Limnol. Oceanogr. 2000. Vol. 45. N 3. P. 569—579.
- Simonsen R. The diatom plankton of the Indian Ocean Expedition of R.V. ‘Meteor’ 1964–65 // Meteor Forschungsgeb. (D. Biol.). 1974. Vol. 19. P. 1—66.
- Hammer Ø., Harper D.A.T., Ryan P. D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis // Palaeontol. Electron. 2009. Vol. 4. N 1.
- Clarke K.R., Gorley R.N. PRIMER v6: User Manual/ Tutorial. Plymouth: PRIMER-E, 2006. 192 p.
- Sapozhnikov V.V., Arzhanova N.V., Mordasova N.V. Hydrochemistry and production-destruction processes in the White sea // The handbook of environmental chemistry / Eds. D. Barceló and A.G. Kostianoy. Berlin, Heidelberg: Springer, 2018. DOI: 10.1007/698\_2018\_302
- Mitchell B.G., Holm-Hansen O. Observations and modeling of the Antarctic phytoplankton crop in relation to mixing depth // Deep-Sea Res. 1991. Vol. 38. N 8–9. P. 981—1007.
- Hasle G.R. Some *Thalassiosira* species with one central process (Bacillariophyceae) // Norw. J. Bot. 1978. Vol. 25. N 2. P. 77—110.
- Park J.S., Jung S.W., Lee S.D., Yun S.M., Lee J.H. Species diversity of the genus *Thalassiosira* (Thalassiosirales, Bacillariophyta) in South Korea and its biogeographical distribution in the world // Phycologia. 2016. Vol. 55. N 4. P. 403—423.
- Rat'kova T.N. Phytoplankton composition in the White Sea Basin in summer—autumn 1998 and 1999 // Berichte Polarforsch. 2000. Vol. 359. P. 97—109.
- Semina H.J. Iconographia Diatomologica, Volume 10: SEM-studied diatoms of different regions of the World Ocean. Koeltz Scientific Books, 2003. 363 p.
- Гозопев P.M. Диатомовые водоросли позднеледника Белого моря // Новости систематики низших растений. 1998. Т. 32. С. 8—13.
- Filatov N., Pozdnyakov D., Johannessen O.M., Pettersson L.H., Bobylev L.P. Oceanographic regime // White Sea. Its marine environment and ecosystem dynamics influenced by global change / Eds. N.N. Filatov and D.V. Pozdnyakov. London: Springer-Verlag London Ltd, 2005. P. 73—154.

Поступила в редакцию  
10.05.18

Принята в печать  
14.09.18

## HYDROBIOLOGY

THE FIRST RECORD OF *THALASSIOSIRA ANGULATA* (BACILLARIOPHYCEAE) BLOOM IN THE WHITE SEA: SPATIAL DISTRIBUTION AND CONCOMITANT SPECIES

I.G. Radchenko<sup>1,\*</sup>, V.P. Shevchenko<sup>2</sup>, M.D. Kravchishina<sup>2</sup>, V.V. Il'inskiy<sup>1</sup>,  
A.P. Georgiev<sup>3</sup>, A.V. Tolstikov<sup>3</sup>, A.L. Tchultsova<sup>4</sup>, L.V. Ilyash<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Hydrobiology, School of Biology,  
Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia;

<sup>2</sup>P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences,  
Nakhimovskii prosp. 36, Moscow, 117997, Russia;

<sup>3</sup>Northern Water Problems Institute of the Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences,  
Aleksandr Nevsky ul. 50, Petrozavodsk, Republic of Karelia, 163061, Russia;

<sup>4</sup>North-Western Department of P.P. Shirshov Institute of Oceanology, Russian Academy of Sciences,  
Severnaya Dvina nab. 112/3, Arkhangelsk, 163061, Russia  
\*e-mail: iraradchenko@yandex.ru

Species composition and biomass of phytoplankton ( $B_{sum}$ ), concentrations of chlorophyll “a” and nutrients, as well as hydrophysical conditions were studied from 5<sup>th</sup> to 12<sup>th</sup> of July, 2011 at 29 stations in the White Sea. With the exception of indicators for two stations in the surface layer of the water column, the values of chlorophyll “a” and  $B_{sum}$  corresponded to the level of phytoplankton bloom ( $> 1 \text{ mg/m}^3$  and  $> 30 \text{ mg C/m}^3$ , respectively). The biomass dominance of diatom *Thalassiosira angulata* was first noted in vast area of the White Sea, its abundance and biomass in the surface layer reached  $24 \cdot 10^3$  cells/l and  $34.56 \text{ mg C/m}^3$ , respectively. Still higher values were noted at one of the coastal stations at a depth of 3 m ( $179 \cdot 10^3$  cells/l and  $258 \text{ mg C/m}^3$ ). The main factors responsible for the spatial variability of the *T. angulata* biomass were the stability of the water column (positive relation) and salinity (negative relation).

**Keywords:** White Sea, phytoplankton bloom, phytoplankton structure, *Thalassiosira angulata*, nutrients, hydrophysical conditions

## Сведения об авторах

Радченко Ирина Георгиевна — канд. биол. наук, доц. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: iraradchenko@yandex.ru

Шевченко Владимир Петрович — канд. геол.-минерал. наук, и.о. зам. директора Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тел.: 8-499-124-77-37; e-mail: vshevch@ocean.ru

Кравчишина Марина Даниловна — канд. геол.-минерал. наук, вед. науч. сотр. лаборатории физико-геологических исследований Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тел.: 8-499-124-77-37; e-mail: kravchishina@ocean.ru

Ильинский Владимир Викторович — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-11-48; e-mail: vladilinskiy@gmail.com.

Георгиев Андрей Павлович — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаборатории гидробиологии Института водных проблем Севера КарНЦ РАН. Тел.: 8-8142-57-65-20; e-mail: a-georgiev@mail.ru

Толстиков Алексей Владимирович — канд. геогр. наук, зав. лабораторией географии и гидрологии Института водных проблем Севера КарНЦ РАН. Тел.: 8-911-402-23-59; e-mail: tolstikov@nwpi.krc.karelia.ru

Чульцова Анна Леонидовна — ст. науч. сотр. Северо-Западного отделения Института океанологии им. П.П. Ширшова РАН. Тел.: 8-8182-23-00-63; e-mail: an-2345@yandex.ru

Ильяш Людмила Васильевна — докт. биол. наук, проф. кафедры гидробиологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-27-91; e-mail: ilyashl@mail.ru

## ФИЗИОЛОГИЯ

УДК 612.821

## ИЗУЧЕНИЕ ХАРАКТЕРИСТИК ИНТЕРФЕЙСА МОЗГ-КОМПЬЮТЕР НА ОСНОВЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЯ ДВИЖЕНИЙ С БЫСТРОДЕЙСТВУЮЩЕЙ ТАКТИЛЬНОЙ ОБРАТНОЙ СВЯЗЬЮ

М.В. Лукоянов<sup>1,2,\*</sup>, С.Ю. Гордлеева<sup>1</sup>, Н.А. Григорьев<sup>1</sup>, А.О. Савосенков<sup>1</sup>,  
Ю.А. Лотарева<sup>1</sup>, А.С. Пимашкин<sup>1</sup>, А.Я. Каплан<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского, 603950, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, д. 23;

<sup>2</sup>Приволжский исследовательский медицинский университет,  
603005, г. Нижний Новгород, пл. Минина и Пожарского, д. 10/1;

<sup>3</sup>Кафедра физиологии человека и животных, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12

\*e-mail: lukoyanovm@gmail.com

Одним из подходов к реабилитации после инсульта является тренировка посредством мысленного представления движения в контуре интерфейса мозг-компьютер (ИМК), позволяющем контролировать результат каждой попытки представления движения. Технология ИМК работает на основе онлайн-анализа электроэнцефалограммы, позволяющего детектировать моменты качественного представления движения (реакцию десинхронизации сенсомоторного ритма) и представить эти события в виде изменения сцены на экране компьютера или срабатывания электромеханических устройств, что по своей сути является обратной связью (ОС). Традиционно используемая в контурах ИМК визуальная ОС далеко не всегда является оптимальной для постинсультных пациентов. Ранее нами исследовалась эффективность тактильной ОС, срабатывавшей только после длительного, в течение нескольких секунд и более, мысленного представления движения. В настоящей работе была исследована эффективность быстрой тактильной ОС в контуре ИМК на основе представления движений при классификации коротких (0,5 с) отрезков электроэнцефалограммы. Было показано, что быстрая тактильная ОС не уступает визуальной по точности классификации и что на ее основе возможно создание ИМК с оперативным подкреплением физиологически эффективных попыток представления движения, работающих с точностью, приемлемой для практического применения. Кроме того, при определенных режимах подачи тактильная ОС может приводить к возникновению у испытуемых более выраженной десинхронизации сенсомоторного ритма, по сравнению с визуальной ОС, что может послужить основой для построения эффективных нейроинтерфейсных тренажеров.

**Ключевые слова:** интерфейс мозг-компьютер, электроэнцефалограмма, представление движений, реабилитация, обратная связь, идеомоторная тренировка

Более трети выживших после инсульта пациентов в той или иной мере страдают остаточными нарушениями двигательной функции [1, 2]. Актуальным поэтому становится последующее применение реабилитационных процедур, направленных на восстановление двигательной функции [3, 4]. Одним из подходов к данной проблеме является тренировка на основе мысленного представления движения, или идеомоторный тренинг, которая приводит к координированной согласно этому движению активации сенсомоторных корковых областей и к соответствующим пластическим перестройкам нейронных сетей [5, 6]. Однако эффективность такого идеомоторного тренинга может быть далеко не полной из-за отсутствия объективного контроля со стороны пациента за яркостью и интенсивностью своих мысленных представлений движения в силу их субъективной природы. В этой связи особенно перспективными становятся реабили-

онные подходы, поддерживающие идеомоторную тренировку посредством технологии интерфейсов мозг-компьютер (ИМК) [7, 8]. Эта технология позволяет электронно-вычислительными средствами детектировать проявление мысленных представлений движения в специфических изменениях характеристик отрезков электроэнцефалограммы (ЭЭГ), например, в виде десинхронизации сенсомоторного ритма, и в реальном времени трансформировать их в сигналы обратной связи (ОС) для пациента. Таким образом, посредством ИМК пациент может объективно контролировать результат каждой своей попытки представления мысленного образа движения, что, очевидно, способствует повышению эффективности идеомоторного тренинга в отношении запуска корковых пластических перестроек и формированию новых двигательных координаций [9].

Однако для постинсультных пациентов, особенно если основное заболевание у них сопровожда-

ется частичными когнитивными или сенсорными нарушениями, требуется тщательная проработка как протокола, так и самой организации контура ОС [10]. В частности, важным становится вопрос о том, в какой сенсорной модальности эта ОС будет подаваться пациенту [11].

В настоящее время при создании ИМК в помощь постинсультным пациентам наибольшее распространение получила визуальная ОС, когда пациент наблюдает результат каждой своей попытки представления движения в виде трансформирующихся экранных объектов или срабатывающих внешних исполнительных устройств, например, экзоскелетов кисти [7, 8]. Однако при всей своей высокой информативности, зрительная ОС требует в ходе тренировки непрерывного фокусирования взгляда на объекте ОС, что в некоторых случаях просто невозможно для пациентов.

В этой связи внимание исследователей все больше привлекают возможности создания каналов ОС в ИМК на основе тактильной стимуляции, посредством микровибромоторов или конструкций с пьезоэлементами, размещаемых на соответствующих участках тела испытуемого [12, 13]. При этом характеристики качества представления движения кодируются параметрами вибросигнала [14] или пространственным расположением самих источников тактильной активации на теле человека [15–17].

Ранее в наших работах [18, 19] было показано, что тактильная ОС ИМК, применявшаяся в качестве подкрепления мысленных образов движения, хотя и была эффективной в выработке навыка подавления сенсомоторного ритма, но не более чем традиционное предъявление обратной сигнализации в зрительной модальности. Однако в этих исследованиях сигнал ОС подавался по завершению сравнительно длительного, до 10 с, наблюдения за электроэнцефалограммой (ЭЭГ) на фоне представления движения и только в случае, если 75% этого периода в ЭЭГ регистрировалась статистически значимая десинхронизация сенсомоторного ритма. Между тем, возможности методики позволяют статистически оценивать степень десинхронизации сенсомоторного ритма каждые 0,5 с [19].

Целью настоящей работы было оценить эффективность тактильной ОС в контуре ИМК на основе представления движения в условиях ее точной синхронизации с моментами подавления сенсомоторного ритма сверх статистически значимого порога на последовательных сегментах мониторинга ЭЭГ длительностью 0,5 с.

### Материалы и методы

**Испытуемые.** Критериями включения в исследование были: возраст от 18 лет, отсутствие патологии ЦНС в анамнезе и на момент обследования, нормальное или скорректированное до нормального зрение. В исследовании приняли участие 6 здоровых испытуемых-добровольцев (5 женщин и один

мужчина) в возрасте 18–28 лет (среднее±стандартное отклонение  $21,7\pm 3,8$ ). Все испытуемые ранее не имели опыта работы с ИМК и были праворукими (среднее±стандартное отклонение  $0,87\pm 0,14$  баллов по данным Эдинбургского опросника мануальной асимметрии [20]). Все испытуемые подписывали информированное согласие на участие в исследовании. Протокол исследования был одобрен этической комиссией Института биологии и биомедицины ННГУ имени Н.И. Лобачевского.

**Регистрация ЭЭГ.** Регистрация ЭЭГ осуществлялась на электроэнцефалографе NVX52 (ООО “Медицинские Компьютерные Системы”, Россия) с 30 Cl/Ag-электродами (F1, Fz, F2, FC5, FC3, FC1, FCz, FC2, FC4, FC6, C5, C3, C1, Cz, C2, C4, C6, CP5, CP3, CP1, CPz, CP2, CP4, CP6, P3, P1, Pz, P2, P4, POz). В качестве референта использовались объединенные электроды, расположенные на мастоидах. Заземляющий электрод располагался на лбу. Контактное сопротивление для всех электродов не превышало 10 кОм. ЭЭГ оцифровывалась с частотой дискретизации сигнала 1000 Гц и фильтровалась в частотном диапазоне 1–30 Гц с Notch-фильтром 50 Гц.

**Структура исследования.** Эксперимент состоял из 3 этапов, каждый из которых проводился в отдельный экспериментальный день. В начале каждого этапа оценивались самочувствие, активность и настроение испытуемого по тесту САН [21]. Во время эксперимента испытуемый располагался в комфортном кресле с подлокотниками и подставкой для ног в положении полулежаче.

Каждый этап эксперимента был разбит на сессии, в ходе которых испытуемый должен был выполнять несколько ментальных задач в ответ на командные пиктограммы, предъявляемые на ЖК-мониторе диагональю 19 дюймов, расположенном на расстоянии 2 м от глаз испытуемого. Между сессиями испытуемый мог отдохнуть в течение необходимого для него времени. В качестве ментальных задач использовались воображаемые движения левой и правой рукой, а также задача “покой”, во время которой испытуемый должен был находиться в состоянии спокойного бодрствования. Команде “покой” соответствовал фиксационный крестик, располагавшийся в центре экрана, воображаемым движениям левой и правой рукой соответствовали стрелки, располагавшиеся слева или справа от фиксационного крестика соответственно. Длительность предъявления пиктограмм на всех этапах эксперимента составляла 5 с, между которыми испытуемому предъявлялся пустой серый экран длительностью 3 с для отдыха. Последовательность предъявления команд была рандомизирована. Каждая сессия, продолжительностью 4 мин, состояла из 10 предъявлений каждой из 3 команд.

На первом этапе эксперимента проводилось обучение испытуемого методике воображаемых движений в ходе не менее чем трех тренировочных сессий. Испытуемому предлагалось выбрать любое

движение рукой, комфортное, по его мнению, для воображения. В качестве примеров приводились “перебор пальцами” и вращение кисти руки в лучезапястном суставе. При этом акцент делался на представлении тактильных ощущений. Успешность освоения методики воображаемых движений определялась по степени десинхронизации сенсомоторного ритма. Для этого сигналы ЭЭГ подвергались пространственной фильтрации при помощи фильтра “Поверхностный Лапласиан” (Surface Laplacian). Далее для каждого канала рассчитывались плотность спектра мощности с шагом 1 Гц и степень десинхронизации как разность мощностей сигнала при представлении движения и сигнала “покой”, отнесенная к мощности сигнала, соответствующей задаче “покой”. Для каждого канала из диапазона 7–16 Гц выбиралась частота с максимальной десинхронизацией, эти значения использовались для построения топограммы, по которой проводилась оценка пространственной локализации и амплитуда максимумов десинхронизации. Если в ходе тренировок уменьшение мощности спектра ЭЭГ в диапазоне 7–16 Гц при воображаемом движении достигало 50% от уровня в состоянии покоя, то испытуемый считался успешно освоившим методику воображаемых движений и допускался для участия во втором и третьем этапах эксперимента.

Второй и третий этапы эксперимента представляли собой оценку уровня точности классификации при работе испытуемого в контуре ИМК с различными вариантами ОС. Каждый из этих этапов состоял из 6 экспериментальных сессий. Первые 3 сессии второго и третьего этапов проводились без предъявления ОС и служили в качестве контроля. Оставшиеся 3 сессии в каждом из этих этапов проводились с предъявлением либо визуальной, либо вибротактильной ОС. Порядок использования визуальной и вибротактильной ОС на втором и третьем этапе эксперимента был рандомизирован среди испытуемых таким образом, чтобы трое испытуемых использовали визуальную ОС на втором этапе эксперимента и вибротактильную ОС на третьем, а остальные три – наоборот. В качестве визуальной ОС на экране предъявлялась вертикальная анимированная полоска зеленого цвета от центра фиксационного крестика до нижнего края экрана, заполняющаяся при верном распознавании команды. Тактильная ОС осуществлялась с помощью вибромоторов (плоские LRA – линейный резонансный привод, linear resonant actuator – без эксцентрика, 3В, диаметр 10 мм, частота работы моторов 500 Гц): на задней стороне шеи располагался вибромотор, информировавший испытуемого об успешном распознавании классификатором ментальной задачи “покой”, а моторы, расположенные на предплечьях правой и левой руки, информировали испытуемого о распознавании в ИМК его представления движения правой и левой рукой соответственно.

Вибромоторы фиксировались на коже при помощи лент-липучек. Для подтверждения правильно классифицированного состояния подавался вибрационный сигнал длительностью 100 мс.

**Классификация изменений в ЭЭГ, характерных для представления движений и подачи ОС.** С помощью специализированного алгоритма классификации анализировались последовательные отрезки записи ЭЭГ длиной 500 мс на предмет детектирования по ЭЭГ ментального усилия с представлением движения. По каждому отрезку ЭЭГ длительностью 500 мс в реальном времени делалось заключение о соответствии текущего сигнала ЭЭГ состоянию воображения движения соответствующей конечностью или состоянию спокойного бодрствования. По факту детектирования состояния воображения движения испытуемому предъявлялась визуальная или тактильная ОС длительностью 200 мс.

Таким образом, классификация изменений в ЭЭГ, характерных для представления движений происходила каждые 500 мс, после чего приостанавливалась на 200 мс для подачи ОС.

Для выделения признаков, значимых для классификации изменений в ЭЭГ, характерных для представления движений, сигнал фильтровался в полосе 7–16 Гц с последующим расчетом коэффициентов индивидуального пространственного CSP-фильтра. Классификация проводилась с использованием метода линейного дискриминантного анализа.

В качестве показателя точности классификации использовалась относительная частота правильной классификации, рассчитываемая как отношение количества правильно классифицированных задач к общему числу задач.

**Статистический анализ.** Для оценки индивидуальных различий в точности классификации периодов представления движений руками использовался критерий Манна-Уитни. Для определения различий в степени десинхронизации при использовании различных видов ОС использовался критерий Вилкоксона. Для группового анализа точности классификации был использован критерий Краскела-Уоллиса. Все тесты проводились с использованием пакета “base” для языка программирования R 3.4.0.

## Результаты

Результаты, полученные в исследовании с участием 6 здоровых испытуемых, достаточно однородны, что позволило не увеличивать выборку сверх указанного числа, учитывая трудоемкость и длительность каждого тестирования. Анализ результативности работы испытуемых в контуре ИМК показал, что на первом этапе исследования у всех испытуемых максимум десинхронизации сенсомоторного ритма наблюдался в отведениях С3 и/или С4 и достигал критерия снижения мощности спектра ЭЭГ в диапазоне от 11 до 14 Гц в 50 и бо-

лее процентов от уровня этой величины в состоянии спокойного бодрствования.

Таким образом, все испытуемые были признаны успешно освоившими методику воображаемых движений и допущены ко второму и третьему этапам для тестирования работы ИМК с различными вариантами обратной связи.

Групповой анализ оценок точности классификации периодов представления движений не выявил различий между четырьмя тестируемыми экспериментальными условиями: контрольное тестирование без ОС перед тестированием с визуальной ОС, тестирование с визуальной ОС, контрольное тестирование без ОС перед тестированием с вибротактильной ОС, тестирование с тактильной ОС (критерий Краскела-Уоллиса = 5,5,  $p = 0,14$ ;  $N = 6$ ,  $df = 3$ ). Средняя точность классификации по всем экспериментальным состояниям составила 61,07% (стандартное отклонение 24,5).

В результате проведенных экспериментов трем (OOM, KLV, PEM – см. таблицу) из шести испытуемых введение обратной связи в контур ИМК позволило улучшить показатели точности классификации. У двоих из этих испытуемых (OOM и KLV) увеличение точности классификации наблюдалось только при использовании визуальной ОС, у одного – только при тактильной ОС.

Для анализа различий в степени десинхронизации ЭЭГ в четырех тестируемых экспериментальных состояниях были выбраны отведения ЭЭГ С3 и С4, поскольку у всех испытуемых в этих позициях наблюдался максимум десинхронизации при представлении движений. Сравнительный анализ показал, что при использовании вибротактильной ОС десинхронизация сенсомоторного ритма ЭЭГ статистически значимо отличается от контроля (отсутствие ОС) для отведения С3 при воображаемых движениях как правой (рис. 1А), так и левой (рис. 1В) рукой. Кроме того, для воображаемых движений левой рукой статистически достоверные различия в десинхронизации ЭЭГ наблюдались и в отведении С4 (рис. 1Г).

При использовании визуальной ОС степень десинхронизации ЭЭГ статистически достоверно

отличалась от контроля только при представлении движений правой рукой в контралатеральном полушарии – отведение С3 (рис. 2).

### Обсуждение результатов

Средняя точность обнаружения в ЭЭГ признаков мысленного представления движения, или точность классификации в контуре ИМК, в настоящем исследовании составила 61%, что было несколько ниже величины в 70%, считающейся минимально необходимой для комфортной работы с ИМК [22]. Этого следовало ожидать, так как фактом правильной классификации в настоящей работе считалось оперативное обнаружение статистически значимого снижения мощности сенсомоторного ритма на коротком участке ЭЭГ длительностью всего 0,5 с, что, конечно, труднее сделать, чем в случае аналогичного действия на участках в несколько секунд, обычно используемых для этого в большинстве работ данного направления.

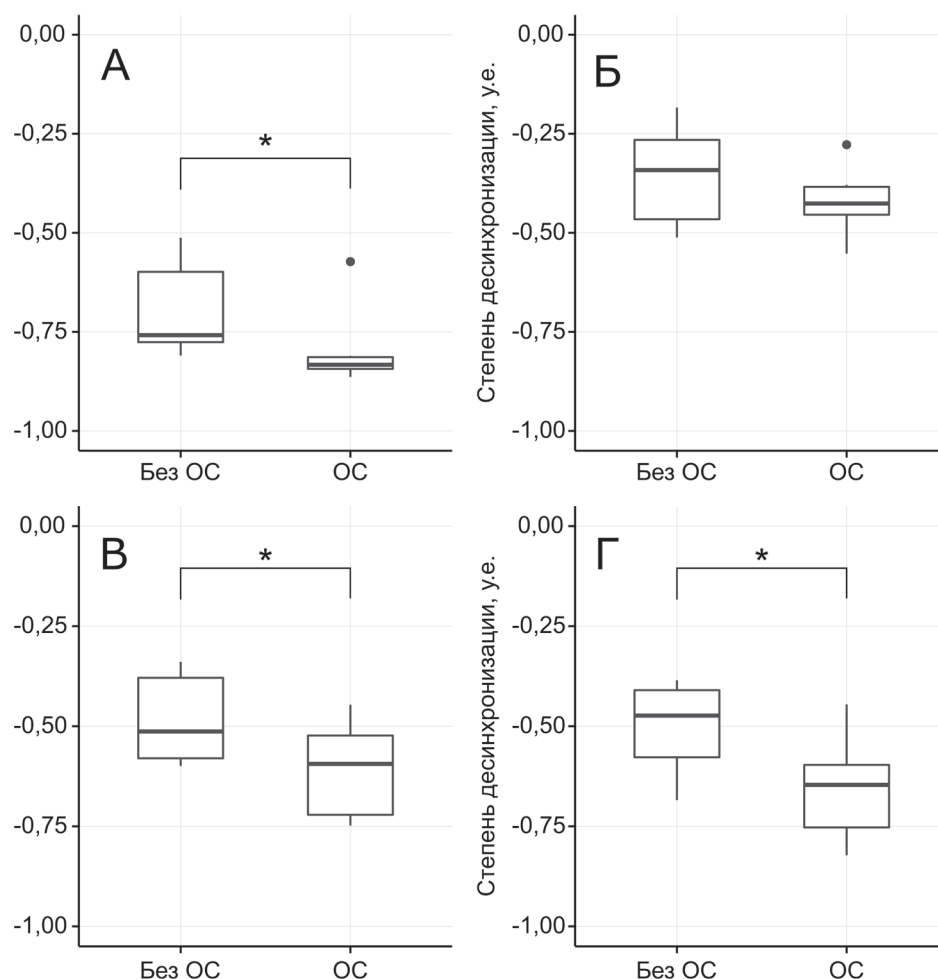
В частности, в выполненном нами ранее исследовании с использованием более длинных, до 10 с, сегментов оценивания ЭЭГ точность классификации с использованием тех же самых, что и в настоящей работе, алгоритмов, действительно была выше и достигала 65,9–73% в среднем для всех испытуемых в различных экспериментальных условиях [19, 23]. Возможно, повышение точности классификации на основе вибротактильной ОС может быть достигнуто, помимо прочего, путем изменения локализации или количества вибромоторов, изменения частоты их работы. Однако собственно глубина десинхронизации сенсомоторного ритма и основанная на этом точность классификации соответствующих отрезков ЭЭГ еще не свидетельствуют о повышении кортикоспинальной возбудимости [6] и, следовательно, не гарантируют запуск соответствующих нужному движению пластических перестроек корковых систем. Поскольку запуск мысленного представления движения осуществляется сознательным усилием испытуемого, то для формирования навыка физиологически активного, вызывающего отклик в сенсомоторных корковых системах, представления важна не только

Таблица

Точность классификации периодов представления движений руками при использовании различных вариантов обратной связи (ОС; среднее ± стандартное отклонение)

| Испытуемый | Без визуальной ОС, % | Визуальная ОС, % | Без тактильной ОС, % | Тактильная ОС, % |
|------------|----------------------|------------------|----------------------|------------------|
| TIV        | 56,7±25,7            | 54,3±26,0        | 57,5±26,3            | 59,0±26,5        |
| OOM        | 57,6±18,8            | 64,4±24,1*       | 64±22,9              | 60,6±26,7        |
| SAV        | 55,2±31,9            | 57,3±21,1        | 60,8±24,9            | 66,0±20,8        |
| KLV        | 54,3±21,6            | 61±19,7*         | 61,0±24,6            | 67,0±22,3        |
| RAD        | 52,7±24,4            | 55,7±24,2        | 55,9±26,5            | 63,3±26,9        |
| PEM        | 75,9±15,7            | 71,1±19,2        | 58,3±26,2            | 72,9±19,6*       |
| Среднее    | 58,7±24,8            | 60,6±23,2        | 59,5±25,3            | 65,3±24,2        |

\* – статистически значимое отличие от контроля ( $p < 0,05$ ).



**Рис. 1.** Сравнение степени десинхронизации при представлении движений руками в контуре ИМК без обратной связи и с вибротактильной обратной связью. Показана степень десинхронизации при воображаемых движениях правой рукой для электрода С3 (А) и С4 (Б), а также левой рукой для электродов С3 (В) и С4 (Г). Статистически достоверные различия обозначены звездочкой (тест Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

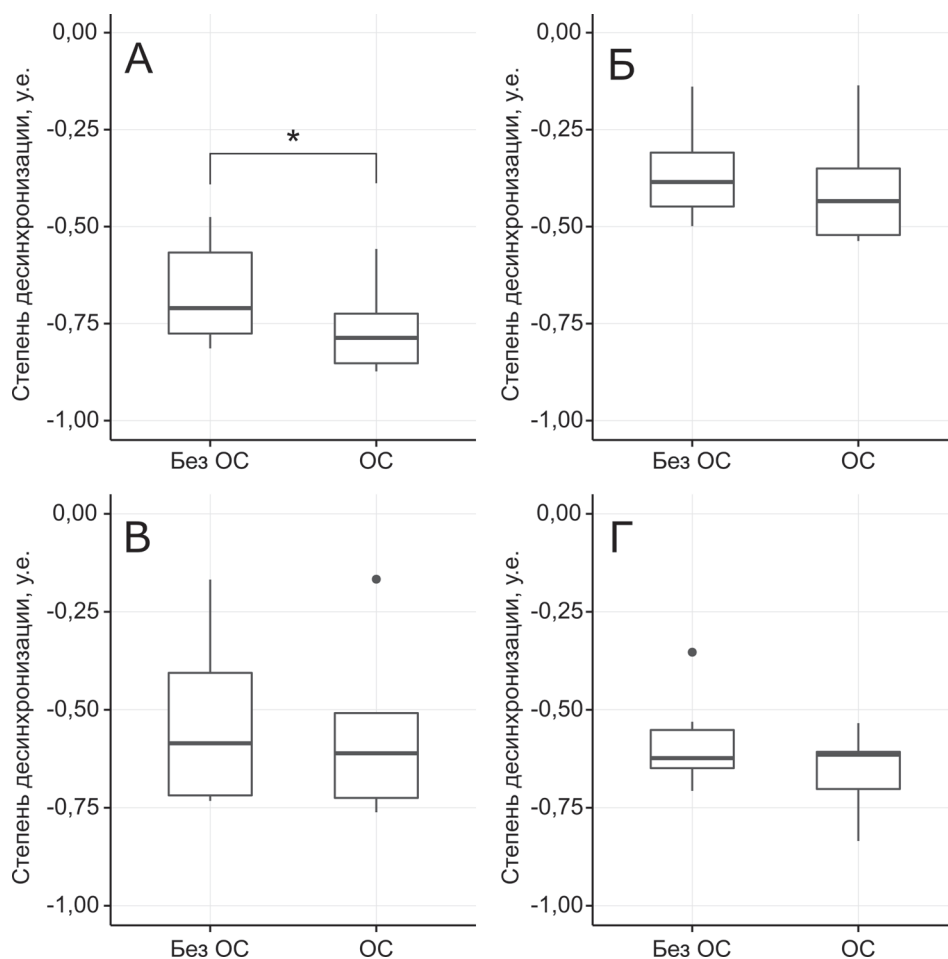
и даже не столько интенсивность этого отклика, сколько оперативная осведомленность испытуемого об эффективности каждого его мысленного усилия. Только в этом случае можно ожидать выработки навыка физиологически действенного, т.е. способствующего формированию пластических перестроек, представления движения [9].

В этом контексте детектируемые, пусть и с несколько меньшей надежностью, но самые первые физиологические проявления процесса представления движения в виде десинхронизации сенсомоторного ритма, предъявляемые испытуемому через ИМК в виде сигналов ОС, могут быть максимально эффективным подкреплением в системе выработки нового двигательного навыка. В то же время, если подавать обратный сигнал только после накопления данных о проявлении десинхронизации сенсомоторного ритма на интервале оценивания ЭЭГ в течение нескольких секунд, то связь между физиологическим эффектом представления движения и его подкреплением, очевидно, может быть существенно ослаблена или вовсе потеряна.

Таким образом, в настоящей работе, во-первых, было подтверждено, что технология ИМК на ос-

нове представления движения с тактильной ОС работает не хуже, чем со зрительной обратной связью, а во-вторых, что на основе тактильной ОС можно построить контуры ИМК с оперативным подкреплением эффективных попыток представления движения. Наконец, было показано, что технология ИМК на основе оценки десинхронизации сенсомоторного ритма на коротких отрезках ЭЭГ (менее 0,5 с) позволяет с приемлемой для целей идеомоторного тренинга точностью обнаруживать в ЭЭГ изменения, характерные для мысленного представления движения.

Результаты анализа собственно процессов десинхронизации ЭЭГ на фоне представления движения показывают, что при определенных режимах подачи ОС тактильная ОС может приводить к возникновению более выраженной десинхронизации ЭЭГ у испытуемых, чем визуальная ОС. Эти результаты согласуются с данными, недавно полученными в работе Барсотти и др. [24], посвященной исследованию эффективности работы ИМК моторно-воображаемого типа с визуально-вибротактильной ОС, которая предъявлялась оператору



**Рис. 2.** Сравнение степени десинхронизации при представлении движений руками в контуре ИМК без обратной связи и с визуальной обратной связью. Показана степень десинхронизации при воображаемых движениях правой рукой для электрода С3 (А) и С4 (Б), а также левой рукой для электродов С3 (В) и С4 (Г). Статистически достоверные различия обозначены звездочкой (тест Манна-Уитни,  $p < 0,05$ )

непрерывно во время выполнения ментальной задачи. Нужно также отметить соответствие полученных нами результатов работе Яо и др. [25], в которой было продемонстрировано, что для повышения эффективности обучения классификатора контура ИМК моторно-воображаемого типа может использоваться вибротактильная стимуляция.

Косвенно факт увеличения выраженности десинхронизации может свидетельствовать о более широкой активации сенсомоторных корковых механизмов у испытуемых при работе в ИМК на основе тактильной ОС, чем в случае визуальной ОС, при условии подачи ОС по факту каждого удачного представления движения в субсекундном диапазоне.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сковороца В.И., Стаховская Л.В., Пряникова Н.А., Мешкова К.С. Вторичная профилактика инсульта // Cons. Medicum. 2006. Т. 8. № 12. С. 70–73.
2. Connell L.A., Lincoln N.B., Radford K.A. Somatosensory impairment after stroke: frequency of different deficits and their recovery // Clin. Rehabil. 2008. Vol. 22. N 8. P. 758–767.
3. Иванова Г.Е., Суворов А.Ю., Стаховская Л.В., Варакко Н.А., Ковязина М.С., Бушков Ф.А. Использование тренажера с многоканальной биологической обратной связью “ИМК-Экзоскелет” в комплексной программе

При неврологических заболеваниях у ряда пациентов наблюдаются нарушения чувствительности или постинсультный болевой синдром, что накладывает ограничения на использование вибротактильной ОС. В целом, полученные в работе данные свидетельствуют о возможности построения контуров ИМК на основе представления движения с оперативной тактильной ОС и, тем самым, о перспективах создания более эффективных систем идеомоторного тренинга для неврологических пациентов, лишенных возможности качественного зрительного контроля визуальной среды.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 15-19-20053).

реабилитации больных после инсульта // Журн. высш. нерв. деят. 2017. Т. 67. № 4. С. 464–472.

4. Cifu D.X., Stewart D.G. Factors affecting functional outcome after stroke: a critical review of rehabilitation interventions // Arch. Phys. Med. Rehabil. 1999. Vol. 80. N 5. P. 35–39.
5. Frolov A.A., Mokienko O.A., Lyukmanov R.K., et al. Preliminary results of a controlled study of BCI-exoskeleton technology efficacy in patients with poststroke arm paresis // Bull. Russ. State Med. Univ. 2016. N 2. P. 16–23.

6. Vasilyev A., Liburkina, S., Yakovlev, L., Perepelkina, O., Kaplan, A. Assessing motor imagery in brain-computer interface training: Psychological and neurophysiological correlates // *Neuropsychologia*. 2017. Vol. 97. P. 56–65.
7. Kaplan A.Y. Neurophysiological foundations and practical realizations of the brain-machine interfaces in the technology in neurological rehabilitation // *Hum. Physiol.* 2016. Vol. 42. N 1. P. 103–110.
8. Frolov A.A., Biryukova E.V., Bobrov P.D., Mokienko O.A., Platonov A.K., Pryanichnikov V.E., Chernikova L.A. Principles of neurorehabilitation based on the brain-computer interface and biologically adequate control of the exoskeleton // *Hum. Physiol.* 2013. Vol. 39. N 2. P. 196–208.
9. Mulder T. Motor imagery and action observation: cognitive tools for rehabilitation // *J. Neural. Transm.* 2007. Vol. 114. N 10. P. 1265–1278.
10. Simmons L., Sharma N., Baron J.-C., Pomeroy V.M. Motor imagery to enhance recovery after subcortical stroke: who might benefit, daily dose, and potential effects // *Neurorehabil. Neural. Repair*. 2008. Vol. 22. N 5. P. 458–467.
11. Vuckovic A., Osuagwu B.A. Using a motor imagery questionnaire to estimate the performance of a Brain-Computer Interface based on object oriented motor imagery // *Clin. Neurophysiol.* 2013. Vol. 124. N 8. P. 1586–1595.
12. Brouwer A.-M., van Erp J.B.F. A tactile P300 brain-computer interface // *Front. Neurosci.* 2010. Vol. 4:19.
13. van der Waal M., Severens M., Geuze J., Desain P. Introducing the tactile speller: an ERP-based brain-computer interface for communication // *J. Neural. Eng.* 2012. Vol. 9. N 4:045002.
14. Chatterjee A., Aggarwal V., Ramos A., Acharya S., Thakor N.V. A brain-computer interface with vibrotactile biofeedback for haptic information // *J. Neuroeng. Rehabil.* 2007. Vol. 4:40.
15. Muramatsu Y., Niitsuma M., Thomessen T. Perception of tactile sensation using vibrotactile glove interface // *IEEE 3rd International Conference on Cognitive Infocommunications (CogInfoCom)* / Ed. S. Hassler. New Jersey: IEEE, 2012. P. 621–626.
16. Thurlings M.E., van Erp J.B.F., Brouwer A.M., Werkhoven P. Controlling a tactile ERP-BCI in a dual task // *IEEE Trans. Comput. Intell. AI Games*. 2013. Vol. 5. N 2. P. 129–140.
17. Yajima H., Makino S., Rutkowski T. M. P300 responses classification improvement in tactile BCI with touch-sense glove // *Signal and Information Processing Association Annual Summit and Conference (APSIPA)* / Ed. S. Hassler. New Jersey: IEEE, 2014. P. 1–7.
18. Либуркина С.П., Васильев А.Н., Гордлеева С.Ю., Каплан А.Я. Интерфейс мозг-компьютер на основе представления движения с вибротактильной модальностью стимулов // *Журн. высш. нерв. деят.* 2017. Т. 67. № 4. С. 414–429.
19. Lukoyanov M.V., Gordleeva S.Y., Pimashkin A.S., Grigor'ev N.A., Savosenkov A.V., Motailo A., Kazantsev V.B., Kaplan A.Y. The efficiency of the brain-computer interfaces based on motor imagery with tactile and visual feedback // *Hum. Physiol.* 2018. Vol. 44. N 3. P. 280–288.
20. Oldfield R.C. The assessment and analysis of handedness: The Edinburgh inventory // *Neuropsychologia*. 1971. Vol. 9. N 1. P. 97–113.
21. Доскин В.А., Лаврентьева Н.А., Мирошников М.П., Шарай В.Б. Тест дифференцированной самооценки функционального состояния // *Вопр. психол.* 1973. № 6. С. 141–145.
22. Ahn M., Jun S. C. Performance variation in motor imagery brain-computer interface: a brief review // *J. Neurosci. Methods*. 2015. Vol. 243. P. 103–110.
23. Gordleeva S.Y., Lukoyanov M.V., Mineev S.A., Khoruzhko M.A., Mironov V.I., Kaplan A.Y., Kazantsev V.B. Exoskeleton control system based on motor-imaginary brain-computer interface // *Совр. технол. в мед.* 2017. Vol. 9. N 3. P. 31–36.
24. Barsotti M., Leonardis D., Vanello N., Bergamasco M., Frisoli A. Effects of continuous kinaesthetic feedback based on tendon vibration on motor imagery BCI performance // *IEEE Trans. Neural Syst. Rehabil. Eng.* 2018. Vol. 26. N 1. P. 105–114.
25. Yao L., Xie T., Shu X., Sheng X., Zhang D., Zhu X. Long-term paired sensory stimulation training for improved motor imagery BCI performance via Pavlovian conditioning theory // *7th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)* / Ed. S. Hassler. New Jersey: IEEE, 2015. P. 90–93.

Поступила в редакцию  
13.07.18

Принята к печати  
14.09.18

## PHYSIOLOGY

### INVESTIGATION OF CHARACTERISTICS OF MOTOR-IMAGERY BRAIN-COMPUTER INTERFACE WITH QUICK-RESPONSE TACTILE FEEDBACK

M.V. Lukoyanov<sup>1,2,\*</sup>, S.Y. Gordleeva<sup>1</sup>, N.A. Grigorev<sup>1</sup>, A.O. Savosenkov<sup>1</sup>,  
Y.A. Lotareva<sup>1</sup>, A.S. Pimashkin<sup>1</sup>, A.Y. Kaplan<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, Gagarin pr. 23, Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

<sup>2</sup>Privolzhskiy Research Medical University, Minin & Pozharsky pl. 10/1, Nizhny Novgorod, 603005, Russia;

<sup>3</sup>Departments of Human and Animal Physiology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye Gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: lukoyanovm@gmail.com

One of the approaches in rehabilitation after a stroke is mental training by representation of the movement using brain-computer interface (BCI), which allows to control the result of every attempt of imaginary movement. BCI technology based on online EEG analysis, detecting

moments of imaginary movement representation and presenting these events in a form of changing scenes on the computer screen or triggering electro-mechanical devices, which essentially is a feedback. Traditionally used visual feedback is not always optimal for post-stroke patients. Earlier, we studied the effectiveness of tactile feedback, triggered only after a long-time mental representation of the movement, for several seconds or more. In this paper, the efficiency of fast tactile feedback with motor imaginary based BCI was investigated during classification of short (0.5 s) EEG segments. It was shown that fast tactile feedback is not inferior to the visual feedback and that it is possible to create BCI with tactile feedback which allow fast reward of physiologically effective attempts of motor imaginary and operate with acceptable accuracy for practical use. Furthermore, under certain conditions, tactile feedback can lead to the greater degree of sensorimotor rhythm desynchronization in subjects, in comparison with the visual feedback, which can serve as a basis for constructing effective neurointerface training system.

**Keywords:** *brain-computer interface, electroencephalography, motor imagery, rehabilitation, feedback, ideomotor training*

#### **Сведения об авторах**

*Лукоянов Максим Викторович* — ассистент кафедры нормальной физиологии Приволжского исследовательского медицинского университета. Тел.: 8-831-465-53-06; e-mail: lukoyanovm@gmail.com

*Гордлеева Сусанна Юрьевна* — канд. физ.-мат. наук, ст. преподаватель кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины ННГУ. Тел.: 8-831-417-32-27; e-mail: gordleeva@neuro.nnov.ru

*Григорьев Никита Андреевич* — инженер лаборатории разработки интеллектуальных биомехатронных технологий Центра трансляционных технологий ННГУ. Тел.: 8-831-417-32-27; e-mail: na0grigorev@gmail.com

*Савосенков Андрей Олегович* — инженер лаборатории разработки интеллектуальных биомехатронных технологий Центра трансляционных технологий ННГУ. Тел.: 8-831-417-32-27; e-mail: andrey.savosenkov@gmail.com

*Лотарева Юлия Александровна* — инженер лаборатории разработки интеллектуальных биомехатронных технологий Центра трансляционных технологий ННГУ. Тел.: 8-831-417-32-27; e-mail: lotarevaj@gmail.com

*Пимашкин Алексей Сергеевич* — канд. физ.-мат. наук, науч. сотр. кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины ННГУ. Тел.: 8-831-417-32-27; e-mail: pimashkin@neuro.nnov.ru

*Каплан Александр Яковлевич* — докт. биол. наук, проф. кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-13-73; e-mail: akaplan@mail.ru

## ЭНТОМОЛОГИЯ

УДК 595.79::591.499.6

ИССЛЕДОВАНИЕ АЛЛОМЕТРИИ ФОРМЫ И ЖИЛКОВАНИЯ  
КРЫЛЬЕВ НАСЕКОМЫХ. ЧАСТЬ 1. HYMENOPTERA

О.А. Беляев\*, С.Э. Фарисенков

*Кафедра энтомологии, биологический факультет, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,  
Россия, 119234, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12**\*e-mail: olegent@yandex.ru*

Аллометрия формы крыла широко распространена среди насекомых, поскольку взаимодействие крыла с воздушной средой и аэродинамика полета во многом зависят от размеров тела. На широком круге представителей перепончатокрылых насекомых была изучена аллометрия формы и жилкования крыльев. Показано, что с увеличением размеров тела возрастает удлинение переднего крыла, и его геометрический центр смещается в сторону основания; аналогичные характеристики задних крыльев с размером насекомых не коррелируют. С помощью методов геометрической морфометрии были выявлены общие для исследованных Hymenoptera аллометрические закономерности в расположении элементов жилкования. При увеличении размеров тела ячейки центральной области переднего крыла растягиваются в продольном направлении, ячейки дистальной и проксимальной зон сокращаются в длину. На заднем крыле у большинства семейств с повышением размеров тела наблюдается удлинение ячеек в проксимальной области и укорочение в дистальной.

**Ключевые слова:** *Hymenoptera*, размеры тела, аллометрия, геометрическая морфометрия, форма крыла, жилкование крыльев

Как известно, размеры тела существенным образом влияют на строение и функции организма [1]. Влияние размеров тела на относительные размеры и объемы органов — это повсеместно распространенное явление среди животных, получившее название “аллометрия”.

Аллометрию, которая проявляется у взрослых организмов, подразделяют на статическую, т.е. различия по форме и относительным размерам органов у особей одного вида, и эволюционную, которая обозначает различия в относительных размерах органов у представителей разных видов. Эволюционная аллометрия базируется на генетических различиях между видами. Статическая аллометрия возникает как вследствие генетических различий между особями, так и под воздействием разных условий среды [2, 3]. У близкородственных видов аллометрия формы крыльев может иметь сходный характер с таковой внутри вида, как было показано для рода *Lutzomyia* (Diptera: Psychodidae) [4]. В то же время среди крупных таксономических групп общие закономерности могут быть не столь явными по причине больших различий в морфологии и экологии их представителей.

Аэродинамика полета зависит от параметров взаимодействия с воздушной средой, которые существенно различаются у мелких и крупных животных. С увеличением размеров тела непропорционально возрастает момент инерции крыла, так как он зависит от квадрата его длины; нелинейно растет сила лобового сопротивления, которая про-

порциональна квадрату скорости движения. При малых размерах тела и низких числах Рейнольдса вклад нестационарных аэродинамических механизмов (дополнительное вихреобразование при пронации и супинации крыльев — “rotational circulation”, хлопок дорсальными сторонами крыльев в верхней точке траектории их движения — “clap and fling” и др.) в создание подъемной силы и силы тяги особенно велик [5]. Эти и многие другие различия в физике полета мелких и крупных насекомых неизбежно сопровождаются изменениями формы крыльев, что было показано в ходе теоретических изысканий [6] и морфометрических исследований [4, 7–9]. Так, в работе Данфорта [7] было изучено влияние размеров тела на форму и жилкование крыльев перепончатокрылых на примере пяти родов пчел. Было обнаружено, что с увеличением размеров тела уменьшается размер птеростигмы, возрастает удлинение переднего крыла, а его геометрический центр смещается в проксимальном направлении; кроме того, происходит растяжение второй радиомедиальной и второй дискоидальной ячеек переднего крыла в продольном направлении. Чтобы более подробно изучить аллометрию формы и жилкования крыльев у Hymenoptera, мы провели похожее исследование, расширив круг объектов до представителей нескольких семейств стебельчатобрюхих и сидячеобрюхих перепончатокрылых и применив более современные и точные методы геометрической морфометрии.

## Материалы и методы

Работа проведена на 238 особях перепончатокрылых — представителях 32 родов (таблица). Некоторые виды одного рода, близкие по массе, рассматривались вместе. Большинство использованных в работе насекомых представляют собой авторские сборы 2011–2015 гг. из лесопарковых зон Москвы, а также с территории Звенигородской биологической станции имени С.Н. Скадовского. Наездники *Bracon* sp. были предоставлены К.Г. Самарцевым из культуры (Зоологический институт РАН).

Большинство видов в настоящем исследовании представлены одним полом, что продиктовано необходимостью снизить возможное влияние полового диморфизма на результаты. В ряде работ было показано, что существует половой диморфизм формы крыла [10]; он может составлять существенную долю внутривидовой изменчивости формы и имеет как аллометрическую, так и неаллометрическую составляющие [11]. У представителей Symphyta были исследованы только самцы, поскольку масса тела самок этих насекомых может значительно варьировать в зависимости от физиологического состояния, связанного с созреванием и откладкой яиц. В случаях, когда отлов самцов ряда стебельчатобрюхих был затруднителен либо невозможен, использовались самки, а также стерильные рабочие особи общественных перепончатокрылых.

Массу тела насекомых измеряли на аналитических весах с точностью до 0,1 мг незамедлительно после фиксации парами этилацетата. В качестве показателя длины тела была выбрана длина торакса, которую измеряли по фотографиям.

По фотографиям передних и задних крыльев, полученных на микроскопе с апохроматическими объективами, в программе AutoCAD 2015 (Autodesk, Inc., США) были вычислены длина и площадь крыльев. Длину крыла определяли как расстояние между основанием и наиболее удаленной от основания точкой апекса. Данный отрезок также принимали за продольную ось крыла. Было определено расположение геометрического центра задних и передних крыльев и расстояние от апекса до точки ортогональной проекции геометрического центра крыла на его продольную ось (рис. 1). Было вычислено соотношение площадей переднего и заднего крыльев.

Для исследованных характеристик мы использовали следующие обозначения:

$m$  — масса тела;

$S$  — суммарная площадь пары крыльев;

$S_f$  — площадь переднего крыла;

$S_h$  — площадь заднего крыла;

$l_f$  — длина переднего крыла;

$l_h$  — длина заднего крыла;

$lc_f$  — расстояние от апекса переднего крыла до точки ортогональной проекции его геометрического центра на продольную ось;

$lc_h$  — расстояние от апекса заднего крыла до точки ортогональной проекции его геометрического центра на продольную ось.

Было рассчитано общее удлинение пары крыльев ( $AR$ ) по формуле:

$$AR = \frac{l_f^2}{S}.$$

Также были вычислены удлинение переднего ( $AR_f$ ) и удлинение заднего ( $AR_h$ ) крыльев:

$$AR_f = \frac{l_f^2}{S_f}.$$

$$AR_h = \frac{l_h^2}{S_h}.$$

Для оценки расположения геометрических центров вдоль продольных осей переднего и заднего крыльев использовали коэффициенты  $lc_f/l_f$  и  $lc_h/l_h$ . Геометрический центр крыла рассчитан как центр масс плоской фигуры, которую образует контур крыла.

Были рассчитаны медианные значения характеристик. Необходимость использования медиан вместо средних значений продиктована относительно небольшими объемами выборок и отличающимся от нормального характером распределений [19]. Для выявления аллометрических изменений формы крыльев был проведен регрессионный анализ медианных значений исследованных характеристик методом главных осей (SMATR) в среде R [12].

Для анализа методами геометрической морфометрии была отобрана большая часть материала: 212 особей — представители 28 родов (таблица). Крылья с неприемлемыми для геометрической морфометрии повреждениями были исключены из анализа. Метки проставляли у основания крыла, в местах ветвлений и пересечений жилок, в том числе в точках впадения жилок в край крыла. В случае жилки, постепенно утончающейся и не достигающей края крыла, метку ставили на пересечении края условной линией, продолжающей такую жилку. В случае резко обрывающейся жилки метку располагали на ее конце. Таким образом, были использованы только метки I и II типа [13, 14], что позволило анализировать различия в расположении элементов жилкования как гомологичных структур.

Оцифровка меток и создание файлов с координатами меток и контурами крыльев были выполнены в программах tpsUtil и tpsDig2 [15, 16]. Для уменьшения ошибки при оцифровке метки для каждого крыла проставляли дважды, затем координаты были усреднены [17]. Морфометрический анализ координат проведен в программе MorphoJ [18]. Статистический анализ выполнен в программе STATISTICA 10 (Statsoft, Inc., США).

Таблица

Число исследованных насекомых, а также их пол и медианные значения размерных параметров

| Семейство        | Вид                              | Пол | Число особей | Масса тела, мг | Длина торакса, мм |
|------------------|----------------------------------|-----|--------------|----------------|-------------------|
| Andrenidae       | <i>Andrena argentata</i> *       | ♂/♀ | 14           | 24,2           | 3,53              |
| Apidae           | <i>Apis mellifera</i> *          | ♀   | 19           | 101,0          | 4,89              |
|                  | <i>Nomada</i> spp.*              | ♀   | 15           | 16,3           | 2,91              |
| Braconidae       | <i>Bracon</i> sp.*               | ♀   | 5            | -              | 1,04              |
|                  | <i>Homolobus annulicornis</i> *  | ♀   | 2            | 23,1           | 4,14              |
|                  | <i>Macrocentrus</i> spp.*        | ♂/♀ | 2            | 0,8            | 1,64              |
|                  | <i>Macrocentrus thoracicus</i> * | ♀   | 2            | 3,2            | 2,13              |
|                  | <i>Phanerotoma</i> sp.           | ♂   | 1            | 1,0            | 1,65              |
|                  | <i>Zelex chlorophthalmus</i> *   | ♀   | 3            | 5,4            | 2,74              |
| Chrysididae      | <i>Chrysis</i> spp.*             | ♂/♀ | 2            | 22,3           | 3,81              |
|                  | <i>Hedychrum gerstaeckeri</i> *  | ♀   | 1            | 14,6           | 3,21              |
|                  | <i>Hedychrum nobile</i> *        | ♀   | 1            | 21,5           | 3,64              |
|                  | <i>Hedychrum rutilans</i> *      | ♀   | 1            | 12,9           | 2,86              |
|                  | <i>Holopyga amoenula</i> *       | ♀   | 1            | 10,8           | 2,77              |
|                  | <i>Pseudomalus</i> sp.           | ♀   | 1            | 5,8            | 2,36              |
|                  | <i>Parnopes grandior</i> *       | ♂/♀ | 8            | 62,3           | 4,83              |
| Crabronidae      | <i>Argogorytes mystaceus</i> *   | ♀   | 10           | 60,1           | 4,52              |
|                  | <i>Bembecinus tridens</i> *      | ♀   | 14           | 21,4           | 2,78              |
|                  | <i>Bembix rostrata</i> *         | ♂   | 10           | 150,7          | 6,03              |
| Ichneumonidae    | <i>Cosmoconus elongator</i> *    | ♂   | 5            | 16,9           | 3,20              |
|                  | <i>Diplazon laetatorius</i> *    | ♂   | 2            | 6,4            | 2,11              |
|                  | <i>Enicospilus ramidulus</i>     | ♀   | 2            | 39,2           | 4,97              |
|                  | <i>Erromenus</i> sp.*            | ♂   | 1            | 13,2           | 2,88              |
|                  | <i>Hadrodactylus</i> sp.*        | ♂   | 1            | 31,0           | 3,78              |
|                  | <i>Ichneumon</i> spp.*           | ♂   | 13           | 40,5           | 4,97              |
|                  | <i>Limerodops elongatus</i> *    | ♂   | 2            | 33,2           | 4,82              |
|                  | <i>Polyblastus varitarsus</i> *  | ♂   | 2            | 10,3           | 2,90              |
|                  | <i>Stenichneumon culinator</i> * | ♂   | 2            | 39,7           | 5,40              |
| Megalodontesidae | <i>Megalodontes cephalotes</i>   | ♂   | 8            | 35,5           | 3,40              |
| Sphecidae        | <i>Ammophila pubescens</i> *     | ♂/♀ | 17           | 34,7           | 4,97              |
|                  | <i>Sphex funerarius</i>          | ♀   | 1            | 72,4           | 8,81              |
| Tenthredinidae   | <i>Athalia</i> spp.*             | ♂   | 6            | 4,6            | 1,92              |
|                  | <i>Tenthredo campestris</i> *    | ♂   | 12           | 46,8           | 3,85              |
|                  | <i>Tenthredo mesomela</i> *      | ♂   | 13           | 30,7           | 3,47              |
| Vespidae         | <i>Discoelius zonalis</i> *      | ♀   | 6            | 61,1           | 5,64              |
|                  | <i>Vespa crabro</i> *            | ♀   | 14           | 388,0          | 7,29              |
|                  | <i>Vespula germanica</i> *       | ♀   | 19           | 73,0           | 5,05              |

Примечание: звездочкой помечены виды, включенные в анализ методами геометрической морфометрии.

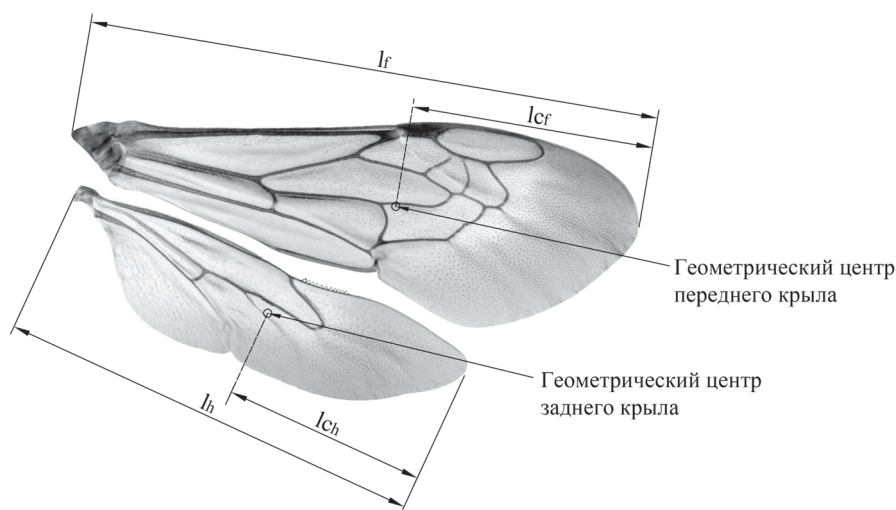


Рис. 1. Схема измерения линейных характеристик крыльев. Расшифровка обозначений дана в тексте (Материалы и методы).

## Результаты и обсуждение

**Регрессионный анализ морфологических характеристик крыльев.** Аллометрические зависимости характеристик формы крыльев от размерных параметров (массы тела и длины торакса) были построены независимо друг от друга.

Обнаружено, что  $AR$  у исследованных перепончатокрылых растёт с увеличением массы тела ( $AR = 2,63m^{0,05}$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2А). Так же аллометрически изменяется  $AR_f = 4,27m^{0,04}$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2Б), при этом геометрический центр переднего крыла смещается в сторону основания ( $L_f/L_{cf} = 0,42m^{0,01}$ ,  $p < 0,05$ ) (рис. 2В). Соотношения  $S_f/S_h$  и  $l_{ch}/l_h$ , а также  $AR_h$  не зависят от размеров тела. Все вышеперечисленные зависимости проявляются сходным образом, если в качестве показателя размеров тела использовать длину торакса, а не прижизненную массу тела. Поэтому правомерно заключение, что при отсутствии возможности измерения массы тела допустимо использование длины торакса для изучения аллометрии у насекомых — по крайней мере, на уровне отрядов.

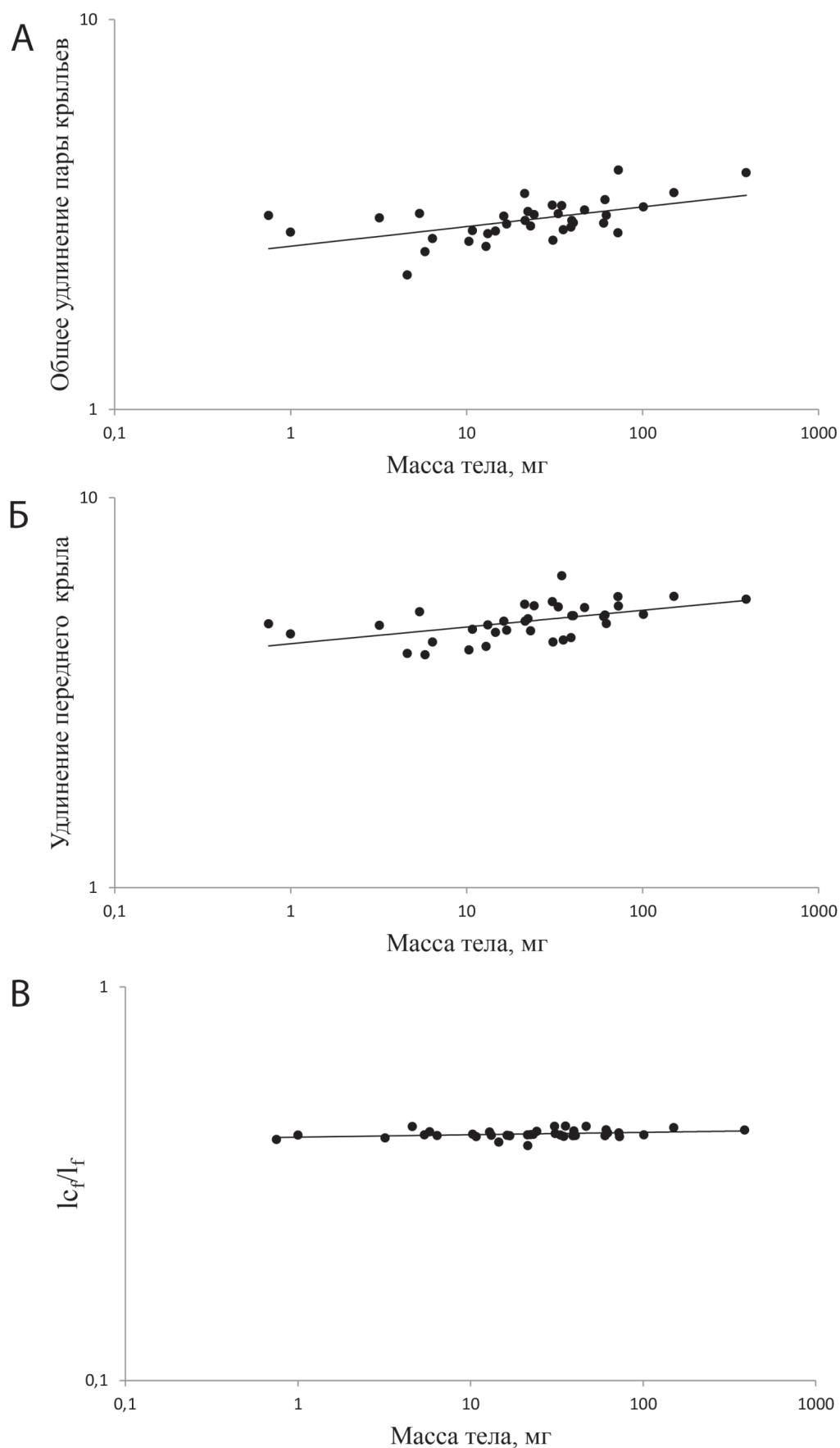
Увеличение  $AR_f$  с ростом размеров тела является закономерным явлением. От удлинения крыла зависит характер образования вихря передней кромки, и при высоких числах Рейнольдса вытянутое крыло более эффективно [6]. Зона вихря передней кромки лежит практически в пределах пластинки переднего крыла; заднее крыло не оказывает влияния на процесс образования этого вихря и его удержания от срыва, поэтому  $AR_h$  и  $l_{ch}/l_h$  не связаны с размерами тела.

**Геометрическая морфометрия.** Анализ методами геометрической морфометрии был проведен отдельно для представителей каждого семейства. Во-первых, таким образом было достигнуто максимально возможное покрытие метками, так как характер жилкования внутри отряда существенно варьирует. Во-вторых, анализировать все семейства как единую выборку с применением такого чув-

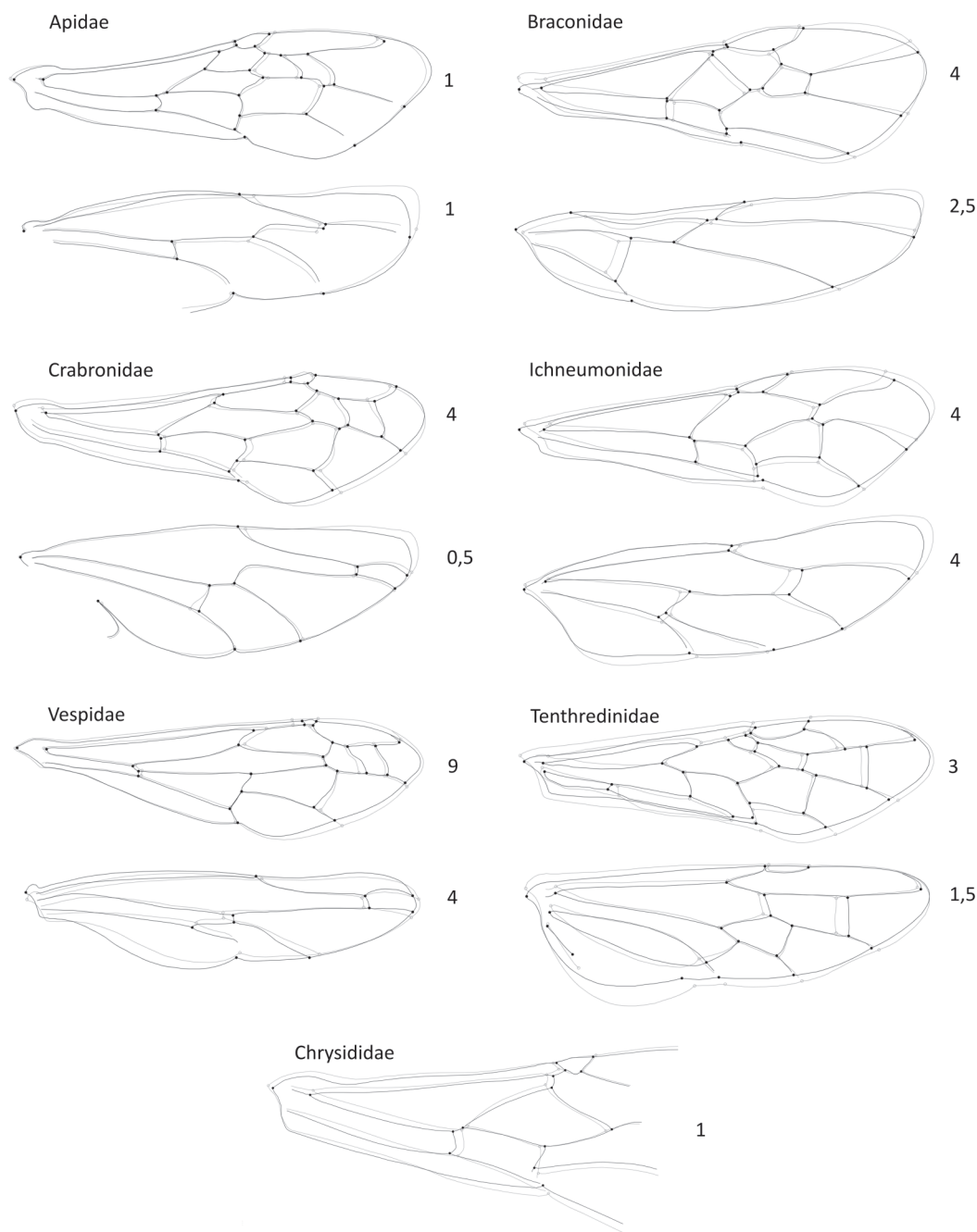
ствительного метода, как регрессионный анализ прокрустовых координат, было бы некорректно. В некоторых случаях жилкование крыльев представителей одного семейства не было однотипным, поэтому часть видов была исключена. Виды, исследованные методами геометрической морфометрии, помечены в таблице. У Chrysidae задние крылья не были проанализированы из-за редуцированного жилкования.

Был проведен корреляционный анализ центроидного размера переднего и заднего крыльев с массой тела и длиной торакса для каждого семейства в отдельности. Для оценки корреляции был использован критерий Спирмена. Мы обнаружили, что для всех исследованных групп длина торакса и масса тела хорошо коррелируют с центроидным размером ( $p < 0,05$ ). Поэтому в дальнейшем в качестве критерия, отражающего размеры тела, был использован центроидный размер.

Для того чтобы выявить наличие изменений в расположении элементов жилкования, связанных с размерами тела, был проведен регрессионный анализ зависимости прокрустовых координат от центроидного размера для передних и задних крыльев. В качестве зависимых переменных выступала форма крыльев отдельных особей. Также при помощи данного метода была определена процентная доля аллометрической вариации формы крыла, которая равна доле предсказанной вариации формы относительно совокупной [11]. Доля аллометрической вариации формы крыла существенно различается у разных исследованных таксономических групп Hymenoptera и составляет от 22% до 75% для переднего крыла и от 22% до 70% — для заднего. Все значения статистически достоверны ( $p < 0,05$ ) по критерию перестановки, использующему нулевую гипотезу об отсутствии зависимости между переменными и эквивалентному тесту Гудала (Goodall's F-test).



**Рис. 2.** Аллометрические кривые зависимостей параметров крыльев от массы тела.  
Расшифровка обозначений дана в тексте (Материалы и методы).



**Рис. 3.** Деформации формы, полученные на основе регрессионного анализа зависимости прокрустовых координат от центроидного размера после исключения остаточной регрессии. Серым контуром с выколотыми точками обозначены эталонные конфигурации, черным контуром с закрасенными точками — конфигурации, соответствующие изменению формы при увеличении центроидного размера. В большинстве случаев масштаб изменений увеличен для наглядности, масштабные коэффициенты приведены. Контурные крыльев построены для лучшего восприятия и не несут точной информации о деформации контура при изменении центроидного размера.

По результатам анализа деформаций формы при изменении центроидного размера (рис. 3) можно утверждать, что для всех представленных семейств существуют общие тенденции в изменении расположения элементов жилкования. Для большинства семейств при увеличении размеров тела характерно укорочение ячеек проксимальной и дистальной части переднего крыла, ячейки центральной части удлиняются в продольном направлении. Чаще всего наблюдаются следующие изменения: укорочение 1Cu (базальная часть крыла); удлине-

ние 1M, 2Cu, 2R1 и 1Rs (центральная часть); укорочение 3Rs, 3M, 3Cu (дистальная часть). На заднем крыле у большинства семейств можно отметить растяжение ячеек R и Cu/1Cu (базальная область крыла), укорочение Rs и M (дистальная область). Относительная площадь птеростигмы сокращается в той или иной степени.

О каких-либо общих тенденциях в расположении жилок относительно поперечной оси крыльев судить сложно. Однако у всех исследованных групп, за исключением пчел (Apiformes), при увеличении

размеров тела происходит сжатие контура переднего крыла в центральной или дистальной области, что согласуется с общим ростом удлинения. В проксимальной области ввиду отсутствия меток на контуре переднего крыла такие изменения проследить не удалось. Контур задних крыльев изменяется по-разному в разных семействах, что наглядно иллюстрирует отсутствие корреляции удлинения заднего крыла с размерами тела.

Авторы благодарны С.А. Белокобыльскому за определение Braconidae, В.Е. Гохману за определе-

ние Ichneumonidae и консультации, А.В. Антропову за помощь в определении некоторых ос и консультации, Н.Б. Винокурову за помощь в определении Chrysidae и консультации, Т.В. Левченко за помощь в определении некоторых пчел и консультации, А.Е. Костюнину за помощь в определении Tenthredinidae и консультации, К.Г. Самарцеву за предоставление *Bracon* sp., а также И.Я. Павлинову, В.М. Карцеву и А.А. Полилову за консультации.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 14-14-00208).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Schmidt-Nielsen K. Scaling: Why is animal size so important? Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1984. 241 p.
2. Cheverud J.M. Relationships among ontogenetic, static and evolutionary allometry // Am. J. Phys. Anthropol. 1982. Vol. 59. N 2. P. 139–149.
3. Shingleton A.W., Frankino W.A., Thomas F.T., Nijhout H.F., Emlen D.J. Size and shape: The developmental regulation of static allometry in insects // BioEssays. 2007. Vol. 29. N 6. P. 536–548.
4. Dujardin J.P., Le Pont F., Baylac M. Geographical versus interspecific differentiation of sand flies: a landmark data analysis // Bull. Entomol. Res. 2003. Vol. 93. N 1. P. 87–90.
5. Chin D.D., Lentink D. Flapping wing aerodynamics: From insects to vertebrates // J. Exp. Biol. 2016. Vol. 219. N 7. P. 920–932.
6. Harbig R.R., Sheridan J., Thompson M.C. Reynolds number and aspect ratio effects on the leading-edge vortex for rotating insect wing planforms // J. Fluid Mech. 2013. Vol. 717. P. 166–192.
7. Danforth B.N. The evolution of hymenopteran wings: the importance of size // J. Zool. Lond. 1989. Vol. 218. N 2. P. 247–276.
8. Francuski L., Vujić A., Kovačević A., Ludoski J., Milankov V. Identification of the species of the *Cheilosia variabilis* group (Diptera, Syrphidae) from the Balkan Peninsula using wing geometric morphometrics, with the revision of status of *C. melanopa redi* Vujić, 1996 // Contr. Zool. 2009. Vol. 78. N 3. P. 129–140.
9. Mielczarek Ł.E., Oleksa A., Meyza K., Tofilski A. Seasonal polyphenism in *Eristalis pertinax* (Diptera: Syrphidae) // Eur. J. Entomol. 2016. Vol. 113. P. 489–496.
10. Pretorius E. Using geometric morphometrics to investigate wing dimorphism in males and females of Hymenoptera – a case study based on the genus *Tachysphex* Kohl (Hymenoptera: Sphecidae: Larrinae) // Aus. J. Entomol. 2005. Vol. 44. N 2. P. 113–121.
11. Gidaszewski N.A., Baylac M., Klingenberg C.P. Evolution of sexual dimorphism of wing shape in the *Drosophila melanogaster* subgroup // BMC Evol. Biol. 2009. Vol. 9:110.
12. Warton D.I., Duursma R.A., Falster D.S., Taskinen S. smatr 3 – an R package forestimation and inference about allometric lines // Methods Ecol. Evol. 2012. Vol. 3. N 2. P. 257–259.
13. Павлинов И.Я., Микешина Н.Г. Принципы и методы геометрической морфометрии // Журн. общ. биол. 2002. Т. 63. № 6. С. 473–493.
14. Zelditch M.L., Swiderski D.L., Sheets H.D., Fink W.L. Geometric morphometrics for biologists: A primer. N.Y.: Elsevier Academic Press, 2004. 443 pp.
15. tpsDig2. Morphometrics at SUNY Stony Brook [Электронный ресурс]. 2013. Дата обновления: 30.01.2018. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (дата обращения: 03.08.2018).
16. tpsUtil. Morphometrics at SUNY Stony Brook [Электронный ресурс]. 2015. Дата обновления: 20.02.2018. URL: <http://life.bio.sunysb.edu/morph> (дата обращения: 03.08.2018).
17. Arnqvist G., Martensson T. Measurement error in geometric morphometrics: empirical strategies to assess and reduce its impact on measures of shape // Acta Zool. Acad. Sci. Hung. 1998. Vol. 44. N 1–2. P. 73–96.
18. Klingenberg, C.P. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics // Mol. Ecol. Resour. 2011. Vol. 11. N 2. P. 353–357.
19. Glantz S.A. Primer of Biostatistics. 4th Edition. N.Y.: McGraw-Hill, 1997. 473 p.

Поступила в редакцию  
05.08.18

Принята к печати  
20.09.18

## ENTOMOLOGY

### A STUDY ON ALLOMETRY OF WING SHAPE AND VENATION IN INSECTS. PART 1. HYMENOPTERA

O.A. Belyaev\*, S.E. Farisenkov

Department of Entomology, School of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskiye gory 1–12, Moscow, 119234, Russia

\*e-mail: olegent@yandex.ru

Allometry of wing shape is very common among insects, since wing-air interaction and aerodynamics of flight are largely depend on body size. In the present work we have studied

allometry of wing shape and venation on wide range of representatives of Hymenoptera. It has been shown that by increase in body size the aspect ratio of forewings grows, and the center of the area shifts towards the base; similar parameters of hindwings do not correlate with size of the insects. Geometric morphometric methods permitted to reveal the allometric tendencies in arrangement of wing vein elements common for the hymenopterans studied. At increase of body size, the cells of central region of forewings stretch in longitudinal direction, the cells of distal and proximal regions reduce in length. Concerning hindwings, most families with increase in body size show elongation of the cells in proximal zone and shortening of the cells in distal zone.

**Keywords:** *Hymenoptera, body size, allometry, geometric morphometrics, wing shape, wing venation*

**Сведения об авторах**

*Беляев Олег Александрович* — мл. науч. сотр. кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: olegent@yandex.ru

*Фарисенков Сергей Эдуардович* — вед. инженер кафедры энтомологии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-16-95; e-mail: littleblacktriangle@gmail.com

УКАЗАТЕЛЬ СТАТЕЙ, ОПУБЛИКОВАННЫХ В ЖУРНАЛЕ  
«Вестник Московского университета. Серия 16. Биология»  
в 2018 году

№ Стр.

**Биофизика**

- Давлетишина Л.Н., Семин Б.К. Кинетика индукции флуоресценции в мембранных препаратах фотосистемы 2 с гетерогенными кластерами металлов (Mn/Fe) в кислород-выделяющем комплексе . . . . . **3** 141
- Кузнецов А.Г., Погосян С.И., Конюхов И.В., Васильева С.Г., Лукьянов А.А., Зотов В.С., Недбал Л., Соловченко А.Е. Возможности оптического мониторинга фосфорного голодания в суспензионных культурах микроводоросли *Chlorella vulgaris* IPPAS C-1 (Chlorophyceae) . . . . . **3** 146
- Маторин Д.Н., Тимофеев Н.П., Глинушкин А.П., Братковская Л.Б., Заядан Б.К. Исследование влияния грибковой инфекции *Bipolaris sorokopiana* на световые реакции фотосинтеза пшеницы с использованием флуоресцентного метода . . . . . **4** 247

**Ботаника**

- Наконечная О.В., Нестерова С.В., Воронкова Н.М. Прорастание семян видов рода *Aristolochia* (Aristolochiaceae) . . . . . **4** 254

**Генетика**

- Александров О.С., Дивашук М.Г., Карлов Г.И. Создание St/J/V-геном-специфичного молекулярного маркера на основе полиморфизма локусов 5S-рДНК *Thinopyrum bessarabicum*, *Pseudoroegneria spicata* и *Dasyphyrum villosum* . . . . . **1** 22
- Лавренев А.Р., Нефедова Л.Н., Ким А.И. Исследование взаимодействия белков семейства HP1 с нетранслируемыми регуляторными областями ретротранспозонов группы gypsy у *Drosophila melanogaster* . . . . . **2** 63

**Геронтология**

- Моргунова Г.В., Клебанов А.А. Экзогенный окисленный гуанозин ухудшает жизнеспособность клеток в стационарной фазе роста . . . . . **3** 153
- Хохлов А.Н., Клебанов А.А., Моргунова Г.В. О выборе контрольных объектов в экспериментально-геронтологических исследованиях . . . . . **2** 72

**Гидробиология**

- Ильяш Л.В., Белевич Т.А., Дриц А.В. Пространственное распределение пикофитопланктона в Белом море в начале лета. . . . . **3** 160
- Михеев М.А., Ипатов В.И., Спиркина Н.Е. Биотические взаимоотношения двух видов микроводорослей в смешанной культуре . . . . . **2** 78
- Радченко И.Г., Шевченко В.П., Кравчишина М.Д., Ильинский В.В., Георгиев А.П., Толстиков А.В., Чульцова А.Л., Ильяш Л.В. Первая регистрация цветения *Thalassiosira angulata* (Bacillariophyceae) в Белом море: пространственное распределение и сопутствующие виды . . . . . **4** 263

### Зоология

- Кузьмина Т.В., Темерева Е.Н. Особенности работы плектолофного лофофора брахиоподы *Coptothyris grayi* (Terebratulida, Rhynchonelliformea) . . . . . **3** 166

### Клеточная биология

- Зеленихин П.В., Горбунова А.С., Бойерляйн К., Макеева А.В., Ильинская О.Н. Индуцированные биназой изменения мембран опухолевых клеток . . . . . **1** 10
- Зорникова К.В., Горностаева А.Н., Андреева Е.Р. Влияние краткосрочного гипоксического стресса на иммуносупрессивную активность периваскулярных мезенхимных стромальных клеток. . . . . **1** 16

### Методы

- Бессонов И.В., Котлярова М.С., Копицына М.Н., Федулов А.В., Мойсенович А.М., Архипова А.Ю., Богуш В.Г., Багров Д.В., Рамонова А.А., Машков А.Е., Шайтан К.В., Мойсенович М.М. Фотоотверждаемые гидрогели, содержащие спидроин или фиброин . . . . . **1** 29
- Чертков О.В., Карлова М.Г., Герасимова Н.С., Соколова О.С. Очистка элонгационных комплексов РНК-полимеразы для изучения методом криоэлектронной микроскопии . . . . . **3** 173
- Юрьева Н.О., Воронков А.С., Терешонок Д.В., Осипова Е.С., Платонова Е.В., Беляев Д.В. Экспресс-метод скрининга трансгенных растений картофеля по интенсивности флуоресценции репортерного белка GFP . . . . . **2** 85

### Микология и альгология

- Анисимова О.В., Штаер О.В. Морфология поровых каналов клеточной стенки у представителей рода *Euastrum* Ralfs (Desmiales) . . . . . **1** 34
- Георгиев А.А., Белякова Г.А., Чудаев Д.А., Георгиева М.Л., Гололобова М.А. Обнаружение красной водоросли *Thorea hispida* (Thore) Desv. (Rhodophyta) в реке Москве . . . . . **1** 38
- Неплюхина А.А., Чудаев Д.А., Крылович О.А., Гололобова М.А. Диатомовые водоросли из торфяного отложения острова Шемья (Алеутские острова, США) . . . . . **2** 93

### Микробиология

- Булаев А.Г., Ерофеева Т.В., Воробьева К.С., Челидзе Г.Г., Рамонова А.А. Влияние органических субстратов на активность архей семейства Ferropasmaceae . . . . . **3** 178
- Васильева С.Г., Шибзухова К.А., Морозов А.С., Лобакова Е.С. Сбор биомассы микроводорослей с помощью сорбентов на основе полиэтиленimina . . . . . **1** 43
- Коробов В.В., Журенко Е.Ю., Жарикова Н.В., Ясаков Т.Р., Маркушева Т.В. Применение штамма-деструктора фенола *Pseudomonas aeruginosa* 21SG для очистки промышленных сточных вод . . . . . **3** 185
- Осмоловский А.А., Звонарева Е.С., Крейер В.Г., Баранова Н.А., Егоров Н.С. Секреция протеиназ с фибринолитической активностью микромицетами рода *Aspergillus* . . . . . **1** 47

### Молекулярная биология

- Герасимов Е.С., Герасимова Н.С., Козлова А.Л., Студитский В.М. Дрожжевой белок Nh-r6A связывается с короткими GC-богатыми генами . . . . . **2** 106
- Горковец Т.К., Армеев Г.А., Шайтан К.В., Шайтан А.К. Совместное влияние аминокислотной последовательности гистона H1 и нуклеотидной последовательности ДНК на структуру хроматосомы: анализ методами молекулярного моделирования . . . . . **2** 99
- Феофанов А.В., Андреева Т.В., Студитский В.М., Кирпичников М.П. Обратимость индуцированных ионной силой структурных перестроек в мононуклеосомах . . . . . **3** 191

### Обзоры

|                                                                                                                                                                                        |          |     |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Бейлин А.К., Гурская Н.Г., Воротеляк Е.А. Методы генной терапии для лечения врожденного буллезного эпидермолиза . . . . .                                                              | <b>4</b> | 233 |
| Духинова М.С. Роль тромбоцитов в нейровоспалительных заболеваниях. Обзор . . . . .                                                                                                     | <b>3</b> | 125 |
| Лысак Л.В., Максимова И.А., Никитин Д.А., Иванова А.Е., Кудинова А.Г., Соина В.С., Марфенина О.Е. Микробные сообщества почв российских полярных станций Восточной Антарктиды . . . . . | <b>3</b> | 132 |
| Челомбитько М.А. Роль активных форм кислорода в воспалении. Мини-обзор . . . . .                                                                                                       | <b>4</b> | 242 |
| Чемерис А.С., Вахрушева А.В., Деркачева Н.И., Соколова О.С. Регуляция комплексом Arp2/3 преобразований актинового цитоскелета в клетке. Обзор . . . . .                                | <b>1</b> | 3   |

### От редактора

|                                                                                                   |          |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Хохлов А.Н. Клеточно-кинетические подходы к поиску геропротекторов: тридцать лет спустя . . . . . | <b>4</b> | 227 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|

### Физиология

|                                                                                                                                                                                                                                                      |          |     |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Григорян Р.К., Крысанова Е.Ю., Кирьянов Д.А., Каплан А.Я. Зрительные стимулы для интерфейса мозг-компьютер на основе зрительных вызванных потенциалов: цвет, форма, подвижность . . . . .                                                            | <b>2</b> | 111 |
| Лукоянов М.В., Гордлеева С.Ю., Григорьев Н.А., Савосенков А.О., Лотарева Ю.А., Пимашкин А.С., Каплан А.Я. Изучение характеристик интерфейса мозг-компьютер на основе представления движений с быстродействующей тактильной обратной связью . . . . . | <b>4</b> | 269 |
| Пустовит К.Б., Потехина В.М., Пахомов Н.В., Кузьмин В.С. Влияние внеклеточного диаденозинтетрафосфата на биоэлектрическую активность предсердного и желудочкового миокарда крысы на ранних этапах постнатального онтогенеза . . . . .                | <b>1</b> | 52  |

### Физиология растений

|                                                                                                                                                                                                                                   |          |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Акиншина Н.Г., Азизов А.А., Штонда Н.И., Халмурзаева А.И., Рахматуллина Н.Ш. Экологическая пластичность фотосинтетического аппарата <i>Hibiscus syriacus</i> L. в условиях высокой температуры, инсоляции и загрязнения . . . . . | <b>3</b> | 197 |
| Ахиярова Г.Р., Коробова А.В., Веселов С.Ю., Кудоярова Г.Р., Веселов Д.С. Влияние удаления корней на содержание цитокининов в клетках апекса побега арабидопсиса . . . . .                                                         | <b>3</b> | 208 |

### Экология

|                                                                                                                                                                   |          |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Попов С.Ю. О распространении <i>Pleurozium schreberi</i> (Bryophyta, Hylocomiaceae) на территории Восточно-Европейской равнины и Восточной Фенноскандии . . . . . | <b>3</b> | 215 |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|

### Энтомология

|                                                                                                                           |          |     |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|
| Беляев О.А., Фарисенков С.Э. Исследование аллометрии формы и жилкования крыльев насекомых. Часть 1. Hymenoptera . . . . . | <b>4</b> | 277 |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------|-----|

## Правила для авторов

Журнал “Вестник Московского университета. Серия 16. Биология” является научным изданием биологического факультета Московского университета имени М.В. Ломоносова. Статьи и материалы, публикуемые в журнале, содержат информацию, касающуюся последних важнейших открытий в области биологии. Разделы журнала соответствуют основным направлениям современных биологических исследований — биохимия, молекулярная биология, вирусология, биофизика, биоинженерия, физиология, ботаника, зоология, эволюционная биология, генетика, микробиология, биология развития, геронтология, экология и др. Издание печатает экспериментальные и методические работы, проблемно-аналитические обзоры и краткие сообщения.

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора наук. Он также публикуется американской компанией “Allerton Press, Inc.” на английском языке под названием “Moscow University Biological Sciences Bulletin”. Оба издания полностью синхронны и выходят четыре раза в год. Желая опубликовать свою статью в журнале необходимо сдать вместе с рукописью авторский договор с издателем журнала, заполненный и подписанный всеми авторами. Авторский договор вступает в силу в случае и с момента принятия статьи к публикации. Форма договора с издателем и дополнительная юридическая информация размещены на сайте МАИК “Наука/Интерпериодика” (<http://pleiades.online/en/journal/bbscimgu/authors-instructions/>). Заполненные и подписанные договоры можно присылать в редакцию в отсканированном виде по электронной почте.

## Общая информация

Сотрудники любых научных учреждений (как российских, так и зарубежных) могут присылать в наш журнал свои статьи, если они написаны на литературном русском языке и оформлены в соответствии с настоящими Правилами.

Все указанные в статье авторы должны нести ответственность за ее содержание. Не принимаются к печати работы, уже опубликованные или отправленные в другие издания, в связи с этим к рукописи должно прилагаться сопроводительное письмо, в котором авторы подтверждают это. Редакция оставляет за собой право осуществлять литературное редактирование рукописей и сокращать статьи. Плата с авторов за публикацию не взимается. Работы, оформленные не по правилам или не соответствующие профилю издания, могут быть отклонены редакцией журнала без рецензирования.

## Структура статьи

Статьи представляются в электронной форме в формате Word 97-2003 (\*.doc), файл со статьей должен быть назван по фамилии автора, а если авторов несколько — по фамилии первого (например, Иванов и др.doc). Объем рукописи, если в ней нет таблиц и рисунков, не должен превышать 3200 слов (шрифт Times New Roman, кегль 12, междустрочный интервал — полуторный, отступ — 1,25, выравнивание по ширине), включая список литературы и резюме на английском языке. В отдельных случаях допустимо увеличение объема по согласованию с редакцией.

На первой странице рукописи в левом верхнем углу следует указать индекс УДК, соответствующий содержанию статьи. В следующих строках приводятся: название работы (заглавными буквами, полужирным шрифтом), инициалы и фамилии авторов (полужирным шрифтом), наименование организации с указанием почтового адреса (курсивом), e-mail автора (отмеченного в заголовке звездочкой), ответственного за переписку с редакцией. После информации о местах работы следуют резюме статьи на русском языке (150–300 слов) и ключевые слова (от 5 до 10, курсивом).

Подробности оформления рукописи можно посмотреть в статье-образце, выложенной на сайте журнала.

Статья должна быть структурирована и включать следующие разделы: введение (слово “введение” не пишется), материалы и методы, результаты, обсуждение результатов (можно объединить с предыдущим пунктом как “результаты и обсуждение”), заключение (не отделяется от предыдущего текста и не имеет подзаголовка), список литературы. Названия разделов печатаются с заглавной буквы без точки в конце (полужирным шрифтом), слова “список литературы” набираются заглавными буквами (обычный шрифт). Произвольная структура допустима для теоретических и обзорных статей, но они также должны содержать резюме и ключевые слова. Страницы публикации должны быть пронумерованы (расположение — нижний колонтитул, середина страницы).

После списка литературы идет строка “Поступила в редакцию....”, где ответственный секретарь редколлегии указывает дату поступления рукописи.

Далее на отдельной странице на английском языке печатаются заглавие, инициалы и фамилии авторов, названия организаций с адресами и e-mail автора, ответственного за переписку, резюме и ключевые слова (полный перевод русской версии, форматирование такое же, как и в “шапке” статьи).

На последней странице приводятся сведения об авторах: фамилия, имя и отчество полностью (курсивом), научная степень, должность, место работы, рабочий телефон (с кодами страны и города), e-mail.

Образец:

*Иванов Иван Иванович* — канд. (докт.) биол. (мед.) наук, ст. (мл.) науч. сотр., (доц., проф.) кафедры..... биологического факультета МГУ. Тел.:8-495-939-...; e-mail:...

## Таблицы и рисунки

Число таблиц и рисунков должно быть минимальным (не более трех единиц суммарно, каждая не более половины листа А4). Не допускается представление одних и тех же материалов в табличной и графической формах. Подписи к рисункам и фотографиям, содержащие расшифровку условных обозначений, приводятся не на самих

иллюстрациях, а на отдельной странице в конце рукописи. Они должны быть информативными и понятными без прочтения статьи. Рисунки и таблицы должны иметь порядковый номер, который указывается при ссылке на них в тексте статьи (пример: рис. 1, табл. 2). Если в статье только один рисунок (или одна таблица), то слово “рисунок” (“таблица”) при ссылке на него в тексте не сокращается и не нумеруется.

Графические иллюстрации и фотографии (только черно-белые!) представляются в формате TIFF в виде отдельных файлов, другие форматы не принимаются. Файлам с рисунками присваивают такое же название, как и файлу статьи, при этом добавляют слово “рис” и порядковый номер (если рисунков несколько). Не допускается вставка рисунков, фотографий и таблиц в основной текст. Пиксельное разрешение фотографий должно обеспечивать ясность всех деталей (не менее 300 точек на дюйм). Если в диаграмме авторами использовалась цветная заливка, то ее следует заменить контрастной штриховкой.

Таблицы печатаются на отдельных страницах после сведений об авторах.

### Список литературы

Указатель литературы к статьям (в порядке упоминания в тексте, а не по алфавиту) должен включать не более 25 ссылок. В обзорных статьях возможно увеличение списка литературы по согласованию с редакцией.

Желательно, чтобы список литературы состоял преимущественно из ссылок на научные статьи, в основном — напечатанные в последнее десятилетие. Ссылки на все остальные варианты публикаций следует свести к минимуму.

В тексте ссылка на цитируемый источник приводится в квадратных скобках с указанием ее порядкового номера. При наличии нескольких источников они перечисляются в порядке возрастания номеров через запятую, например: [3, 5, 8], а если номера идут подряд, то через тире [3–7]. Фамилии иностранных авторов приводятся в тексте статьи на русском языке, например, “...что соответствует выводам Смита [19]”.

Ссылки в списке литературы оформляются следующим образом:

1) **Статья в журнале.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Журнал. Год. Том (Т. или Vol.). Номер (N или №). Страницы.

2) **Книга.** Авторы (инициалы после фамилии). Название. Город: Издательство (без кавычек), год. Общее количество страниц.

3) **Статья в сборнике.** Авторы (инициалы после фамилии). Название статьи // Название сборника / Под ред. (Eds.) Инициалы и фамилия. Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

4) **Тезисы докладов (материалы) конференции.** Авторы (инициалы после фамилии). Название тезисов // Название сборника тезисов (как на обложке сборника). Город: Издательство (без кавычек), год. Страницы.

5) **Автореферат диссертации.** Автор (инициалы после фамилии). Название: Автореф. дис. ... канд. (докт.) биол. наук. Город, год. Общее количество страниц.

6) **Электронный ресурс.** Название сайта [Электронный ресурс]. Год. Дата обновления (если есть): дд.мм.гггг. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг). Дата обращения — это дата последнего посещения сайта, она обязательно должна быть указана.

7) **Электронная публикация.** Авторы (инициалы после фамилии). Название публикации [Электронный ресурс] // Название источника. Год. URL: <http://www...> (дата обращения: дд.мм.гггг).

Если авторов больше 15, то приводятся только фамилии и инициалы первых трех (Сидоров С.С., Иванов И.И., Петров П.П. и др.; Smith A., Jones J., Brown R., et al.). При указании журнала следует приводить его принятое сокращенное название (Бюллетень МОИП — Бюл. МОИП, Journal of Biochemistry — J. Biochem. и т.п.), то же касается и городов (Москва — М., New York — NY и т.д.). Допустимо использовать ссылку на электронную публикацию только в том случае, если статья не издавалась в бумажном виде.

*Примеры оформления источников в списке литературы:*

**Статья в журнале:**

Hayflick L. Progress in cytogerontology // Mech. Ageing Dev. 1979. Vol. 9. N 5–6. P. 393–408.

Хавинсон В.Х. Тканеспецифическое действие пептидов // Бюл. экспер. биол. 2001. Т. 132. № 8. С. 228–229.

**Книга:**

Holliday R. Aging: the paradox of life. Why we age. Dordrecht: Springer, 2007. 134 p.

Птушенко Е.С., Иноземцев А.А. Биология и хозяйственное значение птиц Московской области и сопредельных территорий. М.: Изд-во Моск. ун-та, 1968. 462 с.

**Статья в сборнике:**

Kendeigh S.C., Dolnik V.R., Gavrilov V.M. Avian energetic // Granivorous birds in ecosystem / Eds. J. Pinowski and S.C. Kendeigh. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1977. P. 78–107.

Храмченкова О.М., Бачура Ю.М. Альгодиагностика деградированных почв // Радиация, экология и техносфера: материалы междунар. науч. конф. (Гомель, 26–27 сент. 2013 г.) / Под ред. А.Д. Наумова. Минск: Ин-т Радиологии, 2013. С. 174–176.

**Тезисы докладов (материалы) конференции:**

Болеева Г.С., Борзых А.А. Механизмы повышения адренореактивности артерий почки у крыс с инсулин-зависимым сахарным диабетом // XIX Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных “Ломоносов–2012”, секция “Биология” (9–13 апреля 2012 г.). М.: Макс Пресс, 2012. С. 220–251.

**Автореферат диссертации:**

Борисенков М.Ф. Биоритмы, продолжительность жизни и злокачественные новообразования у человека на Севере: Автореф. дис. ... докт. биол. наук. Сыктывкар. 2012. 23 с.

**Электронный ресурс:**

Senescence.info [Электронный ресурс]. 1997. Дата обновления: 18.08.1989. URL: <http://www.senescence.info> (дата обращения: 11.07.2014).

Официальный сайт ЮНЕСКО [Электронный ресурс]. 2009. URL: <http://www.unesco.org> (дата обращения: 15.05.2013).

**Электронная публикация:**

Bizzarro J.J. Slatyspotted guitarfish (*Rhinobatos glaucostigma*) [Электронный ресурс] // IUCN Red List of Threatened Species. 2009. URL: <http://www.iucnredlist.org> (дата обращения: 10.07.2014).

Ссылки на неопубликованные или находящиеся в печати работы не допускаются.

При цитировании статей, опубликованных в российских журналах и при этом имеющих переводные версии на английском языке, желательно указывать выходные данные англоязычных версий. Это позволит избежать проблем при переводе списков литературы.

**Особенности оформления**

Все размерности физических величин должны соответствовать Международной системе единиц (СИ), например: м — метр, кг — килограмм, мин — минута, ° — градус и т.д. Все сокращения размерностей и величин приводятся по ГОСТу. В десятичных дробях целая часть от дробной отделяется запятой. В тексте можно использовать только прямые кавычки. Цифры до десяти включительно пишутся словами. Знак процента (%) не отделяется от цифры пробелом, например, 50%. Между цифрами всегда ставится тире без пробелов, например, 1–3 км, 50–120 мкл и т.п.

Химические соединения следует указывать согласно номенклатуре, рекомендуемой ИЮПАК (1979 г.). Вместо названий простых веществ допускается использование их формулы, например, хлорид натрия — NaCl, углекислый газ — CO<sub>2</sub> и т.д. Разрешается пользоваться общепринятыми аббревиатурами наиболее часто используемых соединений. К ним относятся: нуклеотиды, нуклеиновые кислоты, аминокислоты (например, аденозинтрифосфорная кислота — АТФ, дезоксирибонуклеиновая кислота — ДНК, аргинин — Арг, валин — Вал). Все прочие нестандартные сокращения должны быть пояснены в тексте при первом упоминании.

Названия генов пишутся курсивом, их продуктов — обычным шрифтом. Например: ген — *FOXO3*, его продукт — FOXO3.

При наличии в тексте русских названий представителей различных царств живых организмов обязательно должны быть указаны соответствующие латинские названия (род, вид), желательно пользоваться Международными кодексами номенклатуры (Международный кодекс ботанической номенклатуры, Международный кодекс номенклатуры бактерий и т.д.). Курсивом выделяются только родовые, видовые и подвидовые названия.

Например: ...два вида кузнечиков подсемейства мечников (*Tettigoniidae*, *Conocephalinae*): мечник обыкновенный *Conocephalus fuscus* (Fabr.) (= *discolor* Thunb.) и мечник короткокрылый *C. dorsalis* (Latr.)...

**Подготовка к печати**

Рукопись, присланная автором, проверяется на соответствие правилам оформления. Если работа не соответствует требованиям, то она возвращается автору без рецензирования. Правильно оформленные статьи поступают на рецензию. После рецензирования рукописи, при необходимости, отправляются авторам на доработку и исправление ошибок. Исправленный вариант статьи должен быть возвращен в редакцию не позднее, чем через две недели, вместе с подробным ответом на все замечания рецензентов. Если автор присылает исправленный вариант позднее указанного срока, статья рассматривается как вновь поступившая. Обе корректуры (русско- и англоязычная) статей направляются авторам на 2–3 рабочих дня, в течение которых необходимо тщательно проверить текст, рисунки, таблицы и т.д., внося в гранки необходимую правку. В случае англоязычной корректуры желательно уделить особое внимание специальным терминам, которые могут быть неправильно интерпретированы переводчиками. Приветствуется практика публикации в английской версии авторских переводов статей.

Вся переписка с редакцией ведется по адресу [vestnik@mail.bio.msu.ru](mailto:vestnik@mail.bio.msu.ru). Просьба указывать в тексте письма мобильные телефоны авторов, ответственных за работу над рукописью.

Ответственный секретарь редколлегии — Моргунова Галина Васильевна (тел.: 8-495-938-27-01; 8-495-939-28-33; моб.: 8-916-074-62-27).

Редакция располагается на биологическом факультете МГУ, “светелка” над зоной “А”, комн. 702, прием авторов — вторник и четверг с 11 до 14 часов.

Дополнительную информацию и статью-образец можно найти на сайтах журнала:

<http://www.bio.msu.ru/doc/index.php?ID=324>

<http://vestnik-bio-msu.elpub.ru>.

**Учредители:**

Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова;  
биологический факультет Московского государственного университета имени М. В. Ломоносова

**Главный редактор**

Кирпичников Михаил Петрович — докт. биол. наук, проф., академик РАН, декан биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова

**Заместитель главного редактора**

Хохлов Александр Николаевич — докт. биол. наук (МГУ имени М. В. Ломоносова)

**Ответственный секретарь**

МОРГУНОВА Галина Васильевна (МГУ имени М. В. Ломоносова)

**Редакционная коллегия:**

АТАБЕКОВ Иосиф Григорьевич — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ВАСИЛЬЕВ Борис Дмитриевич — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ГОЛИЧЕНКОВ Владимир Александрович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ГУСЕВ Николай Борисович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
МАРКОВ Александр Владимирович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ОСТРОВСКИЙ Михаил Аркадьевич — докт. биол. наук, проф. (Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля)  
ПАВЛОВ Дмитрий Сергеевич — докт. биол. наук, проф. (Институт проблем экологии и эволюции имени А. Н. Северцова)  
РАЗИН Сергей Владимирович — докт. биол. наук, проф. (Институт биологии гена)  
РУБИН Андрей Борисович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
СКУЛАЧЕВ Владимир Петрович — докт. биол. наук, проф. (Институт физико-химической биологии имени А. Н. Белозерского)  
ТИМОНИН Александр Константинович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ШЕСТАКОВ Сергей Васильевич — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)  
ШУЛЬГОВСКИЙ Валерий Викторович — докт. биол. наук, проф. (МГУ имени М. В. Ломоносова)

**Редакционный совет:**

АНИСИМОВ Владимир Николаевич — докт. мед. наук, проф. (НИИ онкологии имени Н. Н. Петрова, Санкт-Петербург, Россия)  
ВАСЕЦКИЙ Егор Сергеевич — докт. биол. наук, проф. (Институт онкологии имени Гюстава Русси, Вильжюиф, Франция)  
ВАСИЛЬЕВ Андрей Валентинович — докт. биол. наук, проф. (Институт биологии развития имени Н. К. Кольцова, Москва, Россия)  
КОЛОСОВА Наталья Гориславовна — докт. биол. наук, проф. (Институт цитологии и генетики, Новосибирск, Россия)  
НАУМОВ Александр Дмитриевич — докт. биол. наук, проф. (Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь)  
НЕДОСПАСОВ Сергей Артурович — докт. биол. наук, проф. (Институт молекулярной биологии имени В. А. Энгельгардта, Москва, Россия)  
СТУДИТСКИЙ Василий Михайлович — докт. биол. наук, проф. (Онкологический центр Фокс Чейз, Филадельфия, США)

Редактор Г. В. МОРГУНОВА

Компьютерная верстка Ю. В. Одинцова

Технический редактор / ответственный за интернет-ресурсы А. А. КЛЕБАНОВ

Журнал зарегистрирован в Министерстве печати и информации РФ.

Свидетельство о регистрации № 1561 от 14 февраля 1991 г.

**Адрес редакции:**

119234, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,

биологический факультет МГУ имени М. В. Ломоносова.

Тел.: (495) 938-27-01; факс: (495) 939-28-33; e-mail: [vestnik@mail.bio.msu.ru](mailto:vestnik@mail.bio.msu.ru)

Веб-сайты: <http://www.bio.msu.ru/doc/index.php?ID=324>

<http://vestnik-bio-msu.elpub.ru>

Подписано в печать 07.11.2018. Формат 60×90/8.  
Бумага офсетная. Усл. печ. л. 8,5. Уч.-изд. л. 8,0.  
Тираж экз. Изд. № 11 036. Заказ

Издательство Московского университета.  
119991, Москва, ГСП-1, Ленинские горы, д. 1, стр. 15 (ул. Академика Хохлова, 11).  
Тел.: (495) 939-32-91; e-mail: [secretary@msupress.com](mailto:secretary@msupress.com)  
Отдел реализации. Тел.: (495) 939-33-23; e-mail: [zakaz@msupress.com](mailto:zakaz@msupress.com)  
Сайт Издательства МГУ: <http://msupress.com>

Отпечатано в соответствии с предоставленными материалами в ООО «Амирит». 410004, г. Саратов, ул. Чернышевского, 88.  
Тел.: 8-800-700-86-33 | (845-2) 24-86-33. E-mail: [zakaz@amirit.ru](mailto:zakaz@amirit.ru) Сайт: [amirit.ru](http://amirit.ru)